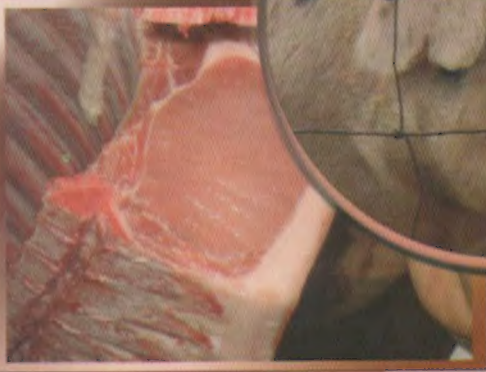


طرق الكشف

عن

جيلاتين ولحوم ودهون الخنزير في الغذاء



د / محمد محمد محمد هاشم



الدار العربية للنشر والتوزيع

طرق الكشف عن جيلاتين ولحوم ودهون الخنزير في الغذاء

إعداد

د. محمد محمد محمد هاشم

أستاذ بكلية الطب البيطري جامعة القاهرة

مستشار جامعة القاهرة لشئون التغذية سابقاً

المستشار العلمي لهيئة المواصفات والمقاييس لدول مجلس التعاون لدول الخليج العربية سابقاً

خبير الصناعات الغذائية بالدار السعودية للخدمات الاستشارية سابقاً

رئيس وحدة أبحاث تجارب الحيوان بكلية الطب

جامعة الملك عبد العزيز سابقاً

عضو المجالس القومية المتخصصة

الطبعة الأولى

2008



الدار العربية للنشر والتوزيع

حقوق النشر

اسم الكتاب: طرق الكشف عن جيلاتين ولحوم ودهون

الخنزير في الغذاء

اسم المؤلف: أ. د/ محمد محمد محمد هاشم

رقم الإيداع: ٢٠٠٨ / ٣٨٠٩

الترقيم الدولي: 977-258-302-x

الطبعة الأولى: 2008

حقوق النشر محفوظة

للمدار العربية للنشر والتوزيع

32 شارع عباس العقاد - مدينة نصر

جمهورية مصر العربية - القاهرة

تليفون: 22753335

فاكس: 22753388

لا يجوز نشر أى جزء من هذا الكتاب، أو اختزان مادته بطريقة الاسترجاع أو نقله على أى وجه، أو بأي طريقة، سواء أكانت إلكترونية، أو ميكانيكية، أو بالتصوير، أو بالتسجيل، أو بخلاف ذلك إلا بموافقة الناشر على هذا كتابة ومقدمات.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

اهداء

إلى حفيدتي

حبيبة أحمد محمد هاشم

اللهم اجعلها من أهل العلم والدين

مقدمة الناشر

يتزايد الاهتمام باللغة العربية فى بلادنا يوماً بعد يوم. ولا شك أنه فى الغد القريب مستعيد اللغة العربية هيبتها التى طالما امتهنت واذلت من أبنائها وغير أبنائها. ولا ريب فى أن امتحان لغة أية أمة من الأمم هو إذلال ثقافى فكرى للأمة نفسها، الأمر الذى يتطلب تضافر جهود أبناء الأمة رجالاً ونساءً طلاباً وطالبات، علماء ومتقنين مفكرين وسياسيين فى سبيل جعل لغة العروبة تحتل مكانتها اللائقة التى اعترف المجتمع الدولى بها لغة عمل فى منظمة الأمم المتحدة ومؤسساتها فى أنحاء العالم لأنها لغة أمة ذات حضارة عريقة استوعبت - فيما مضى - علوم الأمم الأخرى وصهرتها فى بوتقتها اللغوية والفكرية، فكانت لغة العلوم والأدب، ولغة الفكر والكتابة والمخاطبة.

إن الفضل فى التقدم العلمى الذى تتعم به أوروبا اليوم يرجع فى واقعه إلى الصحوه العلمية فى الترجمة التى عاشتها فى القرون الوسطى. فقد كانت المرجع الوحيد للعلوم الطبية والعلمية والاجتماعية هو الكتب المترجمة عن اللغة العربية لابن سينا وابن الهيثم والفارابى وابن خلدون وغيرهم من عمالقة العرب، ولم ينكر الأوروبيون ذلك، بل يسجل تاريخهم ما ترجموه عن حضارة الفراعنة والعرب والإغريق، وهذا يشهد بأن اللغة العربية كانت مطوعة للعلوم والتدريس والتأليف، وأنها قادرة على التعبير عن متطلبات الحياة وما يستجد من علوم، وأن غيرها ليس بأدق منها، ولا أفقر على التعبير.

ولكن ما أصاب الأمة من مصائب وجمود بدأ مع نهاية عصر الوجود التركى، ثم الاستعمار البريطانى والفرنسى مما عاق اللغة عن النمو والتطور، وأبعدها عن العلم والحضارة ولكن عندما أحس العرب بأن حياتهم لا بد من أن تتغير، وأن جمودهم لا بد أن تدب فيه الحياة، اندفع الرواد من اللغويين والأدباء والعلماء نحو إحياء اللغة وتطويرها حتى أن مدرسة قصر العينى فى القاهرة، والجامعة الأمريكية فى بيروت

درستا الطب بالعربية أول إنشائهما. ولو تصفحنا الكتب التى ألفت أو تُرجمت يوم كان الطب يدرس فيها باللغة العربية لوجدناها كتباً ممتازة لا تقل جودة عن مثيلاتها من كتب الغرب فى ذلك الحين، سواء فى الطبع، أو حسن التعبير، أو براعة الإيضاح، ولكن هذين المعهدين تنكرا للغة العربية فيما بعد، وسادت لغة المستعمر. وفُرضت على أبناء الأمة فرضاً، إذ رأى المستعمر أن فى خلق اللغة العربية مجالاً لعرقلة الأمة العربية.

وبالرغم من المقاومة العنيفة التى قابلها، إلا أنه كان بين المواطنين صنائع سبقوا الأجنبى فيما يتطلع إليه، فتقنوا فى أساليب التملق له اكتساباً لمرضاته، ورجال تأثروا بحملات المستعمر الظالمة، يشككون فى قدرة اللغة على استيعاب الحضارة الجديدة، وغاب عنهم ما قاله الحاكم الفرنسى لجيشه الزاحف إلى الجزائر: "علموا لغتنا وانشروها حتى نحكم الجزائر، فإذا حكمت لغتنا الجزائر، فقد حكمناها حقيقة".

فهل لى أن أوجه نداءً إلى جميع حكومات الدول العربية بأن تبادر- فى أسرع وقت ممكن- إلى اتخاذ التدابير، والوسائل الكفيلة باستعمال اللغة العربية لغة تدريس فى جميع مراحل التعليم العام والمهنى والجامعى، مع العناية الكافية باللغات الأجنبية فى مختلف مراحل التعليم لتكون وسيلة الإطلاع على تطور العلم والثقافة والانفتاح على العالم. وكلنا ثقة فى إيمان العلماء والأساتذة بالتعريب، نظراً لأن استعمال اللغة القومية فى التدريس ييسر على الطالب سرعة الفهم دون عائق لغوى وبذلك تزداد حصيلته الدراسية، ويرتفع بمستواه العلمى، وذلك يعتبر تأصيلاً للفكر العلمى فى البلاد، وتمكيناً للغة القومية من الازدهار والقيام بدورها فى التعبير عن- حاجات المجتمع، وألفاظ ومصطلحات الحضارة والعلوم.

ولا يغيب عن حكوماتنا العربية أن حركة التعريب تسير متباطئة، أو تكاد تتوقف بل تحارب أحياناً ممن يشغلون بعض الوظائف القيادية فى سلك التعليم والجامعات ممن ترك الاستعمار فى نفوسهم عقداً وأمراضاً، رغم أنهم يعلمون أن جامعات إسرائيل قد ترجمت العلوم التطبيقية الحديثة إلى اللغة العبرية وعدد من يتخاطب بها فى العالم لا يزيد عن خمسة عشر مليون يهودياً، كما أنه من خلال زياراتى لبعض الدول واطلاعى

عنى مناهجها الدراسية وجدت كل أمة من الأمم تدرس بلغتها القومية مختلف فروع العلوم والآدب والتقنية كاليابان، وإسبانيا، وألمانيا، ودول أمريكا اللاتينية، ولم تشك أمة من هذه الأمم فى قدرة لغتها على تغطية العلوم الحديثة، فهل أمة العرب أقل شأنًا من غيرها ؟!!

وأخيراً .. وتماشياً مع أهداف الدار العربية للنشر والتوزيع، وتحقيقاً لأغراضها فى تدعيم الإنتاج العلمى باللغة العربية، وتشجيع العلماء والباحثين فى إعادة مناهج التفكير العلمى وطرائقه إلى رحاب لغتنا الشريفة تقوم الدار بنشر هذا للكتاب المتميز الذى يعتبر واحداً من ضمن ما نشرته - وستقوم بنشره - الدار من الكتب العربية التى قام بتأليفها أو ترجمتها نخبة ممتازة من أساتذة الجامعات المصرية والعربية المختلفة.

وبهذا ... ننفذ عهداً قطعناه على المضى قدما فيما أردناه من خدمة لغة الوحي وفيما أراده الله تعالى لنا من جهاد فيها.

وقد صدق الله العظيم حينما قال فى كتابة الكريم ﴿ وَقُلْ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ وَسَتُرَدُّونَ إِلَىٰ عَالِمِ الْغَيْبِ وَالْغُحَادَةِ فَيُنَبِّئُكُمْ بِمَا كُنْتُمْ تَعْمَلُونَ ﴾ (106) " سورة التوبة الآية "

محمد أحمد درباله
الدار العربية للنشر والتوزيع

مقدمة

هذه النشرة تبرز بعض طرق الكشف عن جيلاتين ولحوم ودهون الخنزير فى المنتجات الغذائية. وتعتبر مرجعاً علمياً تطبيقياً جديداً وبها إضافات علمية حديثة تفتقر إليها المكتبات العربية والتي تفيد فى التطبيق العلمى والعملى للأطباء البيطريين والمتخصصين.

وانطلاقاً من تحريم الدين الإسلامى الحنيف لأكل لحم الخنزير ومنتجاته، كانت فكرة نشر هذه النشرات العلمية التى تساهم فى الكشف عن جيلاتين ولحوم ودهون الخنزير فى المنتجات الغذائية.

كما أن هيئات المواصفات والمقاييس الإسلامية والعربية والعالمية أولت هذا الموضوع اهتماماً كبيراً فى إيجاد الطرق المختلفة للكشف عن جيلاتين ولحوم ودهون الخنزير فى المنتجات الغذائية وذلك لحماية المستهلك من خطر الأمراض المختلفة التى تنتقل إليه من منتجات الخنزير، ولهذا السبب تبرر أهمية وضع بعض الطرق والأبحاث العلمية المختلفة للكشف عن جيلاتين ولحوم ودهون الخنزير والتى نوردها كما ذكرها مؤلفوها حتى نترك الفرصة لكل مختبر باختيار الطريقة التى تناسبه تبعاً لإمكاناته ونرجو من الله سبحانه وتعالى أن يوفقنا لما فيه الخير لحماية المستهلك من لحوم الخنزير ومنتجاته تبعاً للشريعة الإسلامية السمحاء.

ونحن نعلم بأن أى عمل علمى لا يبلغ الكمال ولهذا برحابة صدر نتقبل من جميع المهتمين فى هذا المجال النقد العلمى الموضوعى أو أى إضافة

أو تعليق حول محتويات هذه النشرة لكي نستفيد منها في الطبقات القادمة إن شاء الله .

وأسأل الله عز وجل أن تكون هذه النشرة علم ينتفع به لوجه الله تعالى
وصلّى الله على سيدنا محمد وعلى آله وصحبه وسلم .

المؤلف

الفصل الاول

أدلة تحريم لحوم الخنزير ومنتجاته في الإسلام

في القرآن الكريم :

١ - يقول الله تبارك وتعالى : ﴿يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا كُلُوا مِن طَيِّبَاتِ مَا رَزَقْنَاكُمْ وَاشْكُرُوا لِلَّهِ إِن كُنتُمْ إِيَّاهُ تَعْبُدُونَ﴾ (١٧٢) إِنَّمَا حَرَّمَ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةَ وَالدَّمَ وَلَحْمَ الْخَنزِيرِ وَمَا أُهْلَ بِهِ لِغَيْرِ اللَّهِ فَمَن اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلَا عَادٍ فَلَا إِثْمَ عَلَيْهِ إِنَّ اللَّهَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ ﴿١٧٣﴾ { البقرة : ١٧٢ ، ١٧٣ } .

٢ - ويقول سبحانه وتعالى : ﴿حُرِّمَتْ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةُ وَالدَّمُ وَلَحْمُ الْخَنزِيرِ وَمَا أُهْلَ لِغَيْرِ اللَّهِ بِهِ وَالْمُنْخَنِقَةُ وَالْمَوْقُوذَةُ وَالْمُتَرَدِّيَةُ وَالنَّطِيحَةُ وَمَا أَكَلَ السَّبُعُ إِلَّا مَا ذَكَّيْتُمْ وَمَا ذُبِحَ عَلَى النُّصُبِ وَأَن تَسْتَقْسِمُوا بِالْأَزْلَامِ ذَلِكُمْ فَسُقَ الْيَوْمَ بِئْسَ الَّذِينَ كَفَرُوا مِن دِينِكُمْ فَلَا تَخْشَوْهُمْ وَاخْشَوْنَ الْيَوْمَ أَكْمَلْتُ لَكُمْ دِينَكُمْ وَأَتِمَمْتُ عَلَيْكُمْ نِعْمَتِي وَرَضِيتُ لَكُمُ الْإِسْلَامَ دِينًا فَمَنِ اضْطُرَّ فِي مَخْمَصَةٍ غَيْرَ مُتَجَانِفٍ لِإِثْمٍ فَإِنَّ اللَّهَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ﴾ {المائدة: ٣} .

٣ - يقول جل وعلا : ﴿قُلْ لَا أَجِدُ فِي مَا أُوحِيَ إِلَيَّ مُحَرَّمًا عَلَى طَاعِمٍ يَطْعَمُهُ إِلَّا أَن يَكُونَ مَيْتَةً أَوْ دَمًا مَّسْفُوحًا أَوْ لَحْمَ خَنزِيرٍ فَإِنَّهُ رِجْسٌ أَوْ فِسْقًا أُهْلَ لِغَيْرِ اللَّهِ بِهِ فَمَن اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلَا عَادٍ فَإِنَّ رَبَّكَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ﴾ {الأنعام : ١٤٥} .

٤ - ويقول تعالى : ﴿كُلُوا مِمَّا رَزَقَكُمُ اللَّهُ حَلالًا طَيِّبًا وَاشْكُرُوا نِعْمَتَ اللَّهِ إِن كُنتُمْ إِيَّاهُ تَعْبُدُونَ﴾ (١١٤) إِنَّمَا حَرَّمَ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةَ وَالدَّمَ وَلَحْمَ الْخَنزِيرِ وَمَا أُهْلَ لِغَيْرِ اللَّهِ بِهِ فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلَا عَادٍ فَإِنَّ اللَّهَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ ﴿١١٥﴾ {النحل : ١١٤ ، ١١٥} .

(*) الأمراض التي تنتقل من الخنازير ومنتجاتها إلى الإنسان يمكن الاطلاع عليها في كتاب الأمراض التي تنتقل من الحيوانات ومنتجاتها إلى الإنسان وطرق الوقاية منها للدكتور محمد محمد هاشم - دار المعارف ٢٠٠٠ م .

الفصل الثانى

الكشف عن جيلاتين الخنزير فى المنتجات الغذائية

استخلاص استافيلوكوكس انتروتوكسين من اللحوم المفرومة
وتقديرها بالامتصاص المناعى بالارتباط الانزيمى (اليسا)

Extraction of staphylococcal Entèrotoxins (SE) From
Minced Meat and Subsequent Detection of SE With Enzyme
- Linked immunosorbent Assay (ELISA)

S. NOTERMANS; R. Boot, P. D. 71PS AND
M.P.DENOOIJ, J of Food pretection, vo. 46. No:3,
pages 238-2241 (1983)

الفصل الثانى

الكشف عن جيلاتين الخنزير

فى المنتجات الغذائية

استخلاص استافيلوكوكس انتروتوكسين من اللحوم المفرومة
وتقديرها بالامتصاص المناعى بالارتباط الانزيمى (اليسا)

اساس الطريقة:

تعتمد هذه الطريقة على استخلاص استافيلوكوكس انتروتوكسين من اللحوم المفرومة وتعيينها بطريقة الامتصاص المناعى بالارتباط الانزيمى وهى استافيلوكوكس انتروتوكسين A ، B ، C ، E ، (SEA ، SEB ، SEC ، SEE) الموجودة فى اللحوم المفرومة (٥٠٪ لحوم بقر ، ٥٠٪ لحوم خنزير).

لحوم مفرومة غير معاملة حراريا نستخلص العينة بكمية متساوية من الماء المقطر عند أس هيدروجينى ٤,٥ ومن ثم يركز المستخلص إلى (10 fold) ويضبط الأس الهيدروجينى عند ٧,٢ وهذا كافى لتعيين أقل من ٠,٥ ميكروجرام من SE/١٠٠ جرام من المنتج. طريقة الاستخلاص تغطى ٤٠ - ٨٠٪ من التوكسين وتستخدم طريقة اليسا ولم تلاحظ نتيجة إيجابية أو سلبية زائفة.

وباستخدام الطريقة السابقة فى استخلاص استافيلوكوكس انتروتوكسين من اللحوم المفرومة المعاملة حرارياً وجدت أنها منخفضة (0.14 FOR SEB). ويحضر مستخلص مركبات أخرى بالمعاملة الحرارية ومنها الجيلاتين الموجود فى اللحوم المفرومة التى تسبب عدم التفاعل المناعى على SEB ، SEC ، SEE أثناء التسخين.

اختبار تغذية القرد (Monkey - feeding tests) تأتي لتوضیح عدم التفاعل المناعی للاستافیلوكوكس إنترتوكسين B فی الجيلاتین % بالمعاملة الحرارية والمرافقة بعدم التفاعل البيولوجی .

الطريقة والمواد

● اللحوم المفرومة:

تخضر اللحوم المفرومة من البقالة والتي تحتوى على ٥٠ % لحوم بقرية، ٥٠ % لحوم خنزیر مفرومة والدهون الموجودة باللحم المفروم حوالی ٣٠ % .

● استافیلوكوكس انترتوكسين:

استافیلوكوكس انترتوكسين A ، B ، C ، E تخضر من ميكروب استافیلوكوكس أوريس ٧٢٢ ، ١٤٤٥٨ ، ١٣٧ ، ٣٢٦ E على التوالي كما شرحها Shinagawa وآخرون وتنقى باستخدام عديد من الكروماتوجرافات .

● حقن اللحوم المفرومة باستافیلوكوكس انترتوكسين:

تذاب كمية من الاستافیلوكوكس انترتوكسين فی ٠,٠٧ من محلول متعادل إم فوسفات الأس الهيدروجینی ٧,٢ محتوی على ١٥ , ٠ إم صوديوم كلوريد يتفاوت من ٣ - ٥٠٠٠ نانوجرام/ جرام تضاف إلى اللحم المفرومة لمدة ٢٤ ساعة قبل الاستخلاص . اللحم المفرومة تخزن أثناء هذه الفترة عند درجة حرارة ٤° س .

تجرى التجارب بواسطة (أ) استافیلوكوكس انترتوكسين مضافا إليها اللحم المفرومة وغير المعاملة حراريا، (ب) اللحم المفرومة المعاملة حراريا المضافة إلى استافیلوكوكس انترتوكسين والتي تضاف بعد التسخين، (ج) والمضاف إليها استافیلوكوكس انترتوكسين إلى اللحم المفرومة المعاملة حراريا .

طرق الاستخلاص:

الطرق المختلفة للاستخلاص والمختبرة هي :

١- تجنيس اللحوم المفرومة المراد الاستخلاص منها في جهاز التجنيس مضافاً إليها كمية متساوية من الماء المقطر .

٢- يضبط الأس الهيدروجيني للحوم المخلوطة عند ٥,٤ مستخدماً ١ إن كلوريد الصوديوم أو عند اس هيدروجيني ٢,٧ مستخدماً ١ إن صوديوم هيدروكسيد .

٣- تدور اللحوم المفرومة في جهاز الطرد المركزي عند ١٠,٠٠٠ لفة في الدقيقة عند درجة حرارة ٥° س لمدة ١٥ دقيقة .

٤- يزال الدهن المتجمد والسائل الطافى (١٠٠ ملل) يضبط أسه الهيدروجيني عند ٢,٧ مستخدماً ١ إن صوديوم هيدروكسيد .

٤- المستخلص يعالج إما بالكلوروفورم أو بالتسخين في حمام مائي يغلى لمدة ٥ دقائق أو لا يعالج .

٥- إذا وجد ترسيب المستخلص يدور في جهاز الطرد المركزي عند ١٠,٠٠٠ لفة في الدقيقة .

٦- المستخلصات المعالجة أو غير المعالجة تديلز ضد محلول بولى ايثلين جليكول (v/w %PEG) .

٧- يوضع المستخلص في أنابيب الديلزه .

طريقة عمل اليسا:

تعيين الاستافيلوكوكس انتروتوكسين بطريقة اليسا في صورة ساندوتش

والمشروحة بواسطة العالم Buhning - pfone وآخرون. الحفر في أطباق من بولى سترين polystyrene والتي يوضع فيها مضاد للاستافيلوكوكس انثروتوكسين IgG من الأغنام (١, ٠ ملل من المضاد SE-IgG يخفف في ٧, ٠, ٠٧ إم من محلول محايد الفوسفات عند أس هيدروجيني ٧, ٢ يحتوى على ١٥, ٠ إم كلوريد صوديوم (PBS) تضاف لكل حفرة وتحضن طول الليل مع الهز عند درجة حرارة ٢٠° س. بعد التحضين تغسل الأطباق بماء جارى من الصنبور والمحتوى على ٠, ٠٥ ٪ توين (Tween) لمدة نصف دقيقة بعد تغطية الحفر العينات المختبرة تحضن (١, ٠ ملل من العينة، مخففة أو غير مخففة بواسطة PBS والمحتوى على ٠, ٠٥ توين ٢٠) والمضافة لكل حفرة.

بعد التحضين لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة ٢٠° س (بعض التجارب تحضن عند درجة حرارة ٤٠° س - انظر إلى النتائج) مع الهز.

تغسل الأطباق كما شرحت سابقاً، الكمية المنتجة من الاستافيلوكوكس انثروتوكسين (SE) تقاس باستخدام مضاد SE-IgG يتحد مع بيروكسيداز (peroxidase) (١, ٠ من المحلول المتحد المخفف في PBS محتوي على ٠, ٠٥ توين ٢٠ يضاف إلى الحفر.

تحضن وتغسل كما شرحت سابقاً ويعين التفاعل الانزيمى بواسطة جهاز الإسبكتوفوتومتر عند ٤٥٠ نانومتر بعد إضافة محلول من ٥ - أمينو - حامض السلسليك، ماء الأكسجين (H_2O_2) (١٥, ٠ ملل من ٠, ٠٧ ٪ من ٥ - أمينو - حامض السلسليك عند أس هيدروجيني ٦ محتوي على ٠, ٠٠٥ ٪ ماء أكسجين تضاف H_2O_2 لكل حفرة.

بعد التحضين لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة ٢٠° س، يقاس امتصاص الضوء).

الـ IgG المركز يستخدم كغلاف، IgG بيروكسيد المرتبط (conjugate) والمركز يقدر بواسطة جهاز Chekarboard titration.

اختبار تغذية القروود : The monkey feeding trst

اختبار النشاط البيولوجي للاستافيلوكوكس انثروتوكسين B، تعطى القروود زنة ٢,٥ كجم بواسطة أنبوب يدخل عن طريق الأنف إلى المعدة التوكسين (جدول ٤) أثناء فترة الاختبار يختبر مصل القروود لوجود الأجسام المضادة للاستافيلوكوكس انثروتوكسين B مستخدماً طريقة الـ يسا. في هذا التكنيك الاستافيلوكوكس انثروتوكسين تغلف أطباق البولي استرين بعد تحضين أمصال القروود المخففة والكمية المتصلة للأجسام المضادة تقاس باستخدام مضادات إمينوجلوبيينات القروود المرتبطة إلى البيروكسيد.

النتائج:

• تعيين الاستافيلوكوكس انثروتوكسين في اللحوم المفرومة غير المعاملة حرارياً والمستخلصات المختلفة المنتجة للاختبار، التجربة القادمة تعطى قناعة بالنتائج:

- ١- يجنس ١٠٠ جرام من اللحوم المفرومة مع ١٠٠ ملل من الماء المقطر.
- ٢- يضبط الأس الهيدروجيني عند ٤,٥.
- ٣- تدور في جهاز الطرد المركزي عند درجة حرارة منخفضة ٥° س.
- ٤- يركز المحلول الطافي عند ٧,٢.
- ٥- يركز المحلول الطافي Ten fold مستخدماً PEG.
- ٦- اللحوم المفرومة المجنسة يضبط الأس الهيدروجيني لها عند ٤,٥ والنتائج عنها مستخلص أقل بروتينات ويسهل تركيزه.

٨- تدور اللحوم المجنسة عند درجة حرارة منخفضة يتج عنها طبقة جافة من الدهن والتي يجب أن تزال.

٩- يعاد ضبط الأس الهيدروجيني للمستخلص عند ٧,٢ والذي لا يسمح بالترسيب ويتجنب أساساً تفاعلات خاصة في طريقة الـيسا. لا يوجد تداخل بالبروتينات سواء عند اختبار المحلول الطافي أو المركز بواسطة الـيسا.

١٠- تعيين الاستافيلوكوكس انتروتوكسين بواسطة الـيسا مستخدماً السائل المستخلص أو المركز المساوي للاستافيلوكوكس انتروتوكسين النقي بواسطة PBS المخفف.

١١- نتيجة الاستخلاص موجودة في جدول رقم (١) (اطلع على اللحوم المفرومة غير المعاملة حرارياً). كمية الاستافيلوكوكس إنتروتوكسين في مجمل المستخلصات المختلفة من ٤٠ - ٨٠٪ من الكمية الأصلية التي أضيفت للحوم المفرومة، هذه النتائج تدل على أن الإستافيلوكوكس انتروتوكسين منتشر بالتساوي بين الطور المائي والطور الجاف للحوم المفرومة المتجانسة. زيادة على ذلك يوجد علاقة مباشرة بين كمية الاستافيلوكوكس انتروتوكسين المستخلصة وكمية الاستافيلوكوكس انتروتوكسين مضافة إلى العينة الأصلية.

١٢- تركيز المستخلص Ten-fold مستخدماً PEG ينتج عنه زيادة في تركيز التوكسين. زيادة التركيز تقريباً من ٥ - ٨ مرات (جدول ١).

١٣- علاج المستخلص بالكلوروفورم يؤدي إلى ارتفاع قيمة البلاك Blank في اختبار الـيسا عند طول موجة ٤٥٠ نانومتر علاوة على ذلك مستخلص الاستافيلوكوكس انتروتوكسين الموجود في الكلوروفورم المركز تعيينه غير دقيق.

١٤- يسخن المستخلص الناتج من النتائج السالبة من SEB، بينما المستخلص من SEA، SEC، SEE شرحت.

١٥- تركيز المستخلص المعالج الناتج فى المنتج على الجيلتين والذى يذوب عند درجات حرارة أعلا من ٣٧° س.

★ تعيين إستافيلوكوكس انثروتوكسين غير المعاملة حراريا فى اللحوم المفرومة المعاملة حراريا

فى هذه التجارب، اللحوم المفرومة تسخن حتى ١٠٠° س لمدة ٢٠ دقيقة بعد إضافة الاستافيلوكوكس انثروتوكسين.

استخدام طريقة الاستخلاص SE وتطبيقها على اللحوم المفرومة غير المعاملة حرارياً تقريباً تعادل المتحصل عليها من اللحوم المفرومة غير المعاملة حرارياً (نتائج لم ترى). تركيز المستخلص بالدليزة ضد PEG الناتج فى المستخلص الصلب الذى يذوب عند درجة ٣٧° س أو أقل تقريباً. إذا كان اختبار اليا تم عند درجة حرارة ٤٠° س، لا يفقد الحساسية المتحصل عليها.

★ تعيين إستافيلوكوكس انثروتوكسين بعد المعاملة حراريا فى اللحوم المفرومة:

١- تضاف استافيلوكوكس انثروتوكسين إلى اللحوم المفرومة غير المعاملة حرارياً.

٢- الخليط يسخن حتى درجة حرارة ١٠٠° س لمدة ٢٠ دقيقة .

٣- تستخدم طريقة الاستخلاص كما شرحنا سابقاً.

٤- عودة بسيطة للاستافيلوكوكس انثروتوكسين المتحصل عليها (جدول ١ تحت SE بعد تسخين اللحوم المفرومة.

٥- إنتاج SEA، SEB منخفض.

٦- كميات SEA ، SEB ، SEC ، SEE الموجودة في المستخلص هي أكبر من ٦ ، ١٤ ، ٣ ، ٤ ، ١٧ ٪ تقريباً على التوالي من الكمية المضافة من الأصل إلى ١٠٠ جرام لحوم مفرومة.

سكون مناعة استافيلوكوكس انتروتوكسين في اللحوم المفرومة بالحرارة:

عودة منخفضة للاستافيلوكوكس انتروتوكسين بعد تسخين اللحوم المفرومة قد تكون بسبب تعديل مناعة الاستافيلوكوكس انتروتوكسين.

في هذا الاختبار ممكن أن تختلف كميات SE المضافة إلى واحد ملل من مستخلصات اللحوم المفرومة المعاملة حرارياً من أجل هذا الغرض المستخلص يركز 10-fold باستخدام PEG. فقد النشاط المناعي أثناء التسخين عند درجة حرارة ١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق تقدر باستخدام الـ يسا. ومن أجل ذلك المعاملة الحرارية للحوم المفرومة سابقاً لا ترسب مرة أخرى عند إعادة تسخين المركز.

من هذه النتائج يأتي وضوح عدم نشاط SEB إلى حد ما (جدول ٢)، SEA ، SEC ، SEE أيضاً غير نشطة عند تركيزها، ولكن مقارنتها بعدم نشاطها في PBS تشاهد عدم نشاط التوكسينات قليلاً.

٦ تأثير الجيلاتين على النشاط المناعي للاستافيلوكوكس انتروتوكسين

تعيين مركبات اللحوم المفرومة معاملة حرارياً عالية الجيلاتين، تأثير الجيلاتين والحرارة على النشاط المناعي للاستافيلوكوكس انتروتوكسين. PES يحتوى على كميات مختلفة من الجيلاتين وعوملت حرارياً حتى ١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق ويقدر النشاط المناعي باستخدام طريقة الـ يسا.

التائج (جدول ٣) تبين أن هناك فقدان للنشاط المناعي تقريباً ٥٠٪ من SE المعاملة حرارياً عند درجة حرارة ١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق في PBS بدون جيلتين. قليلاً (عملية) لا تشهد إضافات تفقد النشاط المناعي للاستربتوكوكس إنتيروكوكس بزيادة كمية الجيلتين، بينما SEB، SEC، SEE تفقد نشاطها بزيادة كميات الجيلتين SEB تفقد معظم نشاطها سريعاً ويتبعها على التوالي SEC، SEE.

محلول ١-٢٪ من ناتج الجيلتين يفقد نشاطه المناعي بالمقارنة لفقد النشاط المناعي للـ SEB، SEC، SEE بالتسخين في اللحوم المفرومة.

التأثير البيولوجي للاستربتوكوكس إنتيروكوكس:

ملاحظة عدم النشاط المناعي في تجارب SEB ترافق بعد النشاط البيولوجي، التجارب المغذاه Feeding tests التي تجرى على قرد واحد (جدول ١). كمية من ١٠ ميكروجرام من SEB المعامل حرارياً في PBS عند درجة حرارة ١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق بالنشاط المناعي من ٢,٥ ميكروجرام للاستربتوكوكس إنتيروكوكس B تسبب قي للقرود.

نفس الكمية من SEB المعاملة حرارياً في الجيلتين نتج عنها انخفاض في النشاط المناعي ولا تشهد أعراض بيولوجية، حتى جزء من ٢٠٠ ميكروجرام من SEB المعامل حرارياً في الجيلتين لا يتج عنها قي في القرد من اختبار القرد أقل حساسية للـ SEB عند نهاية التجارب على القرد المغذى على ١٠ ميكروجرام من SEB غير المعامل حرارياً يقى القرد بعد ساعتين من إعطاء التوكسين.

الآن الأعراض تكون شديدة أكثر من بعد إعطاء ١٠ ميكروجرام من SEB

المعامل حراريا. أثناء المدة كلها للاختبارات القرد لم تتكون عنده أجسام مضادة ضد SEB وتم تعيين ذلك بطريقة اليسا.

جدول (١)

يبيّن استايفلو كوكس انتروتوكسين (SE) في مستخلصات وتركيزات من لحوم مفرومة غير معاملة حراريا وبعد المعاملة حراريا في اللحوم المفرومة

كمية المعينة (نانوجرام/ ملل)				نوع وكمية	
في اللحوم المفرومة غير المعاملة حرارياً		بعد المعاملة حراريا للحوم المفرومة		المضافة إلى اللحوم المفرومة (نانوجرام مم)	
المستخلص (*)	التركيز (**)	المستخلص (*)	التركيز (**)		
١٢	٧٠	غير مختبرة	غير مختبرة	SEA	١٠
٧٨	٧٥٠	أكبر من ٣	أكبر من ٣		١٠٠
غير مختبرة	غير مختبرة	أكبر من ٣	أكبر من ٣		٥٠٠
أكبر من ٢	٨	غير مختبرة	غير مختبرة	SEB	٣
٦	٣٥	غير مختبرة	غير مختبرة		١١
١٧	٩٠	غير مختبرة	غير مختبرة		٣٣
٤٠	غير مختبرة	أكبر من ٢	أكبر من ٢		١٠٠
غير مختبرة	غير مختبرة	أكبر من ٢	أكبر من ٢		٥٠٠
غير مختبرة	غير مختبرة	أكبر من ٢	٧		٥٠٠٠
أكبر من ٢	٩	غير مختبرة	غير مختبرة	SEC	٣
٧	٤٠	غير مختبرة	غير مختبرة		١١
٢٣	١٧٠	أكبر من ٢	أكبر من ٢		٣٣
غير مختبرة	غير مختبرة	٣	١٨		١٠٠
غير مختبرة	غير مختبرة	١٧٠	غير مختبرة		٥٠٠٠
أكبر من ٢	٨	غير مختبرة	غير مختبرة	SEE	٣
٨	٥٠	أكبر من ٢	١١		١١
١٦	٨٨	٦	٢٨		٣٣
غير مختبرة	غير مختبرة	١٧	٩٠		١٠٠
غير مختبرة	غير مختبرة	٨٥٠	غير مختبرة		٥٠٠٠

(*) ١٠٠ جرام لحوم مفرومة استخلصت بواسطة ١٠٠ ملل ماء مقطر عند ١ س هيدروجيني ٤,٥.

(**) المستخلص (١٠٠ ملل) ركز 10-fold مستخدماً PEG.

جدول (٢)

يبين فقد النشاط المناعى للاستافيلوكوكس انثروتوكسين (SE) بعد المعاملة حرارياً (١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق) فى تركيز المستخلص للحوم المفرومة المعاملة حرارياً وفى PBS

نوع التوكسين	فقد النشاط المناعى (*) فى	
	المستخلص المركز	PBS%
SEA	٦٣	٦٣
SEB	أقل من ٩٩,٥	أقل من ٩٩,٥
SEC	٧٩	٧٩
SEE	٧٠	٧٠

(*) النشاط المناعى محسوب من المنحنى القياسى للاستافيلوكوكس انثروتوكسين المخفف إما فى المستخلص المركز أو فى PBS

جدول (٣)

يبين فقد النشاط المناعى للاستافيلوكوكس انثروتوكسين (SE) بعد المعاملة الحرارية (١٠٠° س لمدة ١٠ دقائق) فى PBS المحتوى على زيادة كمية الجيلاتين

كمية الجيلاتين (%w/v)	المعاملة الحرارية	فقد النشاط المناعى (*)			
		SEA	SEB	SEC	SEE
صفر	لا يوجد	صفر	صفر		
صفر	١٠٠ لمدة ١٠ دقائق	٢٤٥	٢٦٠		
٠,١	١٠٠ لمدة ١٠ دقائق	٢٤٥	٢٩٢		
٠,٣	١٠٠ لمدة ١٠ دقائق	٢٤٥	٢٩٤		
١	١٠٠ لمدة ١٠ دقائق	٢٥٠	٢٩٨		
٣	١٠٠ لمدة ١٠ دقائق	٢٥٧	أقل من ٢٩٩,٥		
١٠	١٠٠ لمدة ١٠ دقائق	٢٦٠	أقل من ٢٩٩,٥		

(*) النشاط المناعى حسب من المنحنى القياسى للاستافيلوكوكس انثروتوكسين المخفف فى PBS

جدول (٤)

النشاط المناهي والبيولوجي للاستافيلوكوكس انثروتوكسين B (SEB) المعامل حراريًا في الجيلاتين (10% w/v) عند درجة حرارة ١٠٠°س لمدة ١٠ دقائق

رد الفعل على الفرد	إجمالي النشاط المنتهي في الميكروجرام	المعاملة الحرارية	الوسيط Medium	إجمالي كمية SEB المنتملة (ميكروجرام)
لا يوجد	٠,٥	١٠٠°س لمدة ١٠ دقائق	PBS	٢
نق	٢,٥	١٠٠°س لمدة ١٠ دقائق	PBS	١٠
لا يوجد	٠,٠١	١٠٠°س لمدة ١٠ دقائق	جيلاتين (10%w/v)	١٠
لا يوجد	٠,٠٤	١٠٠°س لمدة ١٠ دقائق	جيلاتين (10%w/v)	٥٠
لا يوجد	٠,١٠	١٠٠°س لمدة ١٠ دقائق	جيلاتين (10%w/v)	٢٠٠
نق	١٠	غير معاملة حرارياً	PBS	١٠

المناقشة:

الغذاء الملوث بالاستافيلوكوكس أوريس قبل أو بعد المعاملة الحرارية. طرق المستخلصات تختبر بواسطة استخدام:

أ - الغذاء غير المعامل حرارياً المحتوي على الاستافيلوكوكس انثروتوكسين.

ب- الغذاء المحتوي على SE بعد التسخين.

ج - الغذاء المحتوي على SE المعامل حراريًا من مستخلصات مختلفة بطرق مختبرة، واضح أن اللحوم المفرومة غير المعاملة حرارياً واللحوم المفرومة المعاملة حرارياً مضاف إليها SE بعد التسخين. المستخلص البسيط بالماء المقطر يعطى نتائج مقنعة. نتائج مشابهة تم الحصول عليها بواسطة العالمان Buning - Pfaue الذين قاموا باختبار فانيليا كاسترد.

مستخلص SE بعد المعاملة الحرارية للحوم المفرومة، مستخدماً ماء مقطر، يعطى نتائج أقل اقتناعاً وعلى سبيل المثال SEB تغطى فقط ١٤, ٠٪ (جدول ١). أقل تغطية قد تحدث بتغطية SE فى اللحوم (منشأ الجيلاتين) أو المناعة غير النشطة للتوكسين. اللحوم المفرومة المحتوية على كمية من الأنسجة الضامة والمواد الغضروفية. بناءً عليه وجود كلاجين. نتائج تسخين الكلاجين فى نسيج البروتين الذى قد يكون مغلف للتوكسين. إذا كان SE مرتبط باللحوم المفرومة والمخلوطة بالماء المقطر يجوز إزالتها بالتريسيب المتحصل بعد تدويرها فى جهاز الطرد المركزى المخلوط. . بينما SEB يفقد قليلاً من النشاط المناعى كذلك بعد التسخين فى المستخلصات المركزة للحوم المفرومة والمعاملة حرارية. يظهر بوضوح أن الجيلاتين فى اللحوم المفرومة على الأقل واحد من المواد مشمول عن تثبيط نشاط SEB، SEC، SEE بتسخين اللحوم المفرومة متساوياً مع تثبيط الحرارة لبعض التوكسينات فى PBS والمحتوى على ١ - ٢٪ جيلاتين. يسلم بأن التثبيط المناعى لثلاث أنواع من التوكسين فى اللحوم المفرومة توجد إلى حد كبير بالجيلاتين. هذه تعرف بأن المعاملة الحرارية SE الموجودة فى البروتينات قد تسرع فى تثبيط النشاط للـSE. العالمان Stterlee وkraft وجدوا أن التسخين للـSEB فى وجود الميوسين أو ميموجلوبين ينتج عنه فقد سريع للنشاط المناعى للتوكسين. باختبار تغذية القرد يأتى بوضوح التثبيط المناعى للـSE فى الجيلاتين مترافق مع التثبيط البيولوجى.

هذا يدل على أن الاختبارات لكل من SEB، SEC، SEE المعاملة حرارياً فى اللحوم المفرومة لا تبرهن على أن على الاحتياج لطريقة الاستخلاص SEA. غير نشط بالتسخين فى المستخلصات المركزة للحوم المفرومة. لا يمكن عزل SEA المرتبط باللحوم المفرومة والتي قد تزال بالتريسيب المتحصل عليها بعد التدوير فى جهاز الطرد المركزى لزج الخليط.

الاستافيلوكوكس انثروتوكسين تحتاج إلى أبحاث حول نشاطها البيولوجي بعد التسخين في اللحوم المفرومة.

في هذه الدراسة أقل كمية للاستافيلوكوكس انثروتوكسين توجد في اللحوم المفرومة لم يمكن تعيينها. حساسية طريقة الـ IgG تعتمد على الكيف لـ IgG المستخدم للمادة الخاضعة للتفاعل الانزيمي وكذلك عوامل أخرى.

هذه الدراسة تدل على أن البروتين الموجود في كل من المستخلصات وترسيب للحوم المفرومة ومحتويها على الجيلاتين هذا لا يتداخل في طريقة الـ IgG.

هذه البراهين تدل على أن حساسية طريقة الـ IgG تعتمد على كمية للأجسام المضادة المستخدمة.

المراجع الأجنبية:

- 1- Bergdoll, M. S. 1970. Enterotoxins. pp. 265-326 in T. C. Montic, S. Kadis and S. J. Ajl (ed.), Microbial toxins, Vol. 3. Academic Press, New York.
- 2- Buning-Pfaue, H., P. Timmermans, and S. Notermans. 1980. Einfache Methode für den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin in Vanillepudding mittels ELISA-Test. Lebensm. Unters. Forsch. 173: 351-355.
- 3- Cassman. E. P., R. W. Bennet. A. E. Dorsey, and J. E. Stone 1969. The microslide double gel diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. Health Lab. Sci. 6:185-198 con't. p. 244.
- 4- Hauschild, A. H. W., and R. Hilsheimer. 1980. Incidence of *Clostridium botulinum* in commercial bacon. J. Food Prot. 43:564-565.

- 5- Hauschild, A. H. W., R. Hilsheimer, G. Jarvis, and D. P. Raymond. 1982. Contribution of nitrite to the control of *Clostridium botulism* in liver sausage. J. Food Prot. 45:500-506.
- 6- Insalata, N. F., S. J. Witzeman, G. J. Fredericks, and F. C. A. Sunga, 1979. Incidence study of spores of *Clostridium botulinum* in convenience foods. Appl. Microbiol. 17:542-544.
- 7- Keyman, A., and Z. Evenchik, 1969. Activation, pp. 359-396. In G. W. Gould and A. Hurst (eds.) The bacterial spore. Academic Press, New York.
- 8- Mises, R. V. 1942. On the current use of Bayes formula. Ann. Math. Stat. 13:156-165.
- 9- National Research Council, Committee on Nitrite and Alternative Curing Agents in Food. 1981. The health effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. Part. 1. National Academy Press, Washington, DC.
- 10- Roberts, T. A., and J. L. Smart. 1977. The occurrence of clostridia, particularly *Clostridium botulinum*, in bacon and pork. pp. 911-915. In A. N. Barker, J. Wolf, D. J. Ellar, G. J. Dring and G. W. Gould (eds.) Spore research 1976. vol. II. Academic Press, New York.
- 11- Stumbo, C. R. 1973. Thermobacteriology in food processing, 2nd ed. Academic Press, New York.
12. Taclindo, C., T. Midura, G. S. Nygaard, and H. L. Bodily. 1967. Examination of prepared foods in plastic packages for *Clostridium botulinum*. Appl. Microbiol. 15:426-430.

الفصل الثالث

الكشف عن لحوم الخنزير ومنتجاته
فى المنتجات الغذائية

الكشف عن لحوم الخنزير ومنتجاته فى المنتجات الغذائية بطريقة كورتكس المطورة(*)

قام فريق العمل بمختبر الهيئة العربية السعودية للمواصفات والمقاييس منذ عام ١٤١٤ هـ بتخطيط وتنفيذ عدد ٤ مخططات للكشف عن كفاءة مجموعات الكشف شملت اختبار عدد ١١٧ عينة يمكن تقسيمه إلى المجموعات التالية : (المسلسل من رقم ١ إلى رقم ٤ تم الكشف عليها طبقاً لطريقة الشركة بالضبط .

١ - أنواع مختلفة من اللحوم الشائعة النقية من آثار لحم الخنزير (بقر - غنم - جمل - دجاج - أرنب - سمك) وكذلك فول الصويا كمنتج يضاف إلى اللحم المفروم وذلك لتحديد إمكانية ظهور تفاعلات ثانوية مضللة من هذه البروتينات .

٢ - تركيزات متدرجة من لحم الخنزير فى لحم بقر حتى تركيز واحد فى العشرة آلاف كذلك نفس التركيزات ولكن من شحم الخنزير الخام فى لحوم الأبقار أو من خليط من شحم ولحم الخنزير مع لحم البقر وذلك لتحديد مدى حساسية المجموعات لأقل تركيز ممكن الكشف عنه بتطبيق طريقة الشركة بالضبط .

٣ - بعض عينات منتجات اللحوم السابق الكشف عنها بمعرفة الهيئة من حوالى ثلاثة سنوات وجد فى حينها احتمال وجود آثار لحم خنزير بها وتم الاحتفاظ بها لإجراء مثل هذه الاختبارات كأثلة للتلوث .

(*) معد هذه النشرة رئيس أعضاء فريق العمل على التطوير الذى استكمل العمل بعد مغادرة .

١. د. محمد إبراهيم السعداوى لهيئة المواصفات والمقاييس السعودية .

٤ - عينات لمنتجات اللحوم المستوردة تم سحبها من السوق ومن محلات الوجبات السريعة بمعرفة بعض أعضاء فريق العمل وذلك لمعرفة مدى ملائمتها للعمل الروتينى .

٥ - الطريقة التى أوردتها الشركة تتلخص فى استخلاص أهم عينه باستخدام ٩ مل محلول كلوريد صوديوم ٩, ٠ ٪ ثم يؤخذ من المستخلص ١, ٠ مل يضاف إليها ٩, ٠ مل محلول تخفيف (ضمن مكونات المجموعة) ويؤخذ من المحلول المخفف ١, ٠ مل توضع فى حفره من حفر الـ Microplate السابق تغطيتها بالأجسام المضادة للحم الخنزير ويتم التحضين لمدة ساعة مع الهز ثم الغسيل الأولى ٥ مرات ثم يضاف محلول آخر من الأجسام المضادة المرتبطة بإنزيم خاص ويحضن مع الهز لمدة ١٠ دقائق ثم الغسيل الثانى ٥ مرات بعدها يضاف مادة التفاعل يحضن مع الهز لمدة ٢٠ دقيقة حيث يظهر لون أزرق فى الحفر التى اختبر بها عينات ملوثة بلحم الخنزير وفى النهاية يضاف محلول إيقاف التفاعل الذى يحول اللون الأزرق إلى أصفر يتم قياس شدة امتصاص بجهاز Microplate reader .

٦ - من الواضح أن طريقة الشركة المشار إليها فى البند السابق يتم فيها تخفيف العينة بدرجة كبيرة مما يؤدي إلى إفلات تركيزات آثار لحم الخنزير المنخفضة من الظهور إن وجدت وعليه فقد أجرت الهيئة بعض التعديلات على هذه الطريقة لزيادة كفاءتها بتقليل هذه التخفيفات وزيادة معدل استخلاص العينة ورفع قيم الامتصاص للعينات الملوثة وخاصة الملوثة بتركيزات بسيطة جداً وتتلخص هذه التعديلات فى استخلاص ١٠ جم من العينة باستخدام ٥ مل محلول استخلاص (مكون من ٥٠٠ مل ٩, ٠ ٪ منظم فوسفات رقمه الأيدروجينى ٩, ٦ + ٤٠٠ مل محلول كلوريد صوديوم + ١٠٠ مل كحول إيثايل) فى استخلاص مركزياً وأخذ ١, ٠ مل من الرائق مباشرة فى

حفرة الـ Microplate كذلك زيادة مرات الغسيل الأولى-إلى ٨ مرات وزيادة فترة تحضين مادة التفاعل إلى نصف ساعة .

وقد قام فريق العمل بتنفيذ هذا التعديل على بعض العينات التى تحتوى على تركيزات متدرجة من لحم الخنزير فى لحم بقر حتى تركيز واحد فى المليون . كذلك اختبر فريق العمل نفس العينات باتباع نفس تعديل الهيئة ولكن استبدل محلول الاستخلاص الذى استنبطته الهيئة بمحلول كلوريد الصوديوم ٩, ٠ ٪ المستخدم فى طريقة الشركة .

قام فريق العمل باختبار عينات بها تركيزات متدرجة من لحم الخنزير فى لحم بقر حتى تركيز فى العشرة آلاف بنفس طريقة الشركة مع زيادة وزن العينة إلى ٢ جم ، ٣ جم ، بدلاً من ١ جم المستخدمة فى طريقة الشركة .

وكانت النتائج كالتالى:

١ - لم تظهر أى فاعلات جانبية أو قراءات إمتصاص متداخلة وغريبة تؤثر على الناتج من أى اختبار من الاختبارات التى تم إجراؤها . كما أعطيت عينات اللحوم الشائعة النقية من آثار الخنزير نتائج سلبية بوضوح تام .

٢ - بتطبيق طريقة الشركة بالضبط أمكن الكشف عن آثار لحم وشحم الخنزير الخام حتى تركيز ١ فى الألف بوضوح تام لا يقبل الالتباس .

٣ - أعطيت أغلب عينات منتجات اللحوم الدانيماركية السابق لكشف عنها بمعرفة الهيئة نتائج موجبة لوجود آثار لحم وشحم الخنزير بتطبيق طريقة الشركة .

٤ - لم تعطى أى عينة من عينات منتجات اللحوم المستوردة التى تم سحبها من السوق ومن محلات الوجبات السريعة بمعرفة أعضاء فريق العمل أى نتائج موجبة لوجود آثار لحم الخنزير بتطبيق طريقة الشركة .

٥ - بتطبيق التعديلات التى أدخلها فريق العمل أمكن الكشف عن آثار مخلوط لحم وشحم الخنزير الخام الملوث للحم البقر حتى تركيز واحد فى المليون بوضوح تام وعند استبدال محلول الاستخلاص بمحلول كلوريد الصوديوم أعطى تركيز واحد فى المليون نتائج موجبة أيضاً ولكن أقل وضوحاً ، فى حين أعطى لحم البقر النقى من آثار لحم الخنزير تماماً المستخدم فى التجربة نتيجة سالبة بوضوح تام عند تطبيق نفس تعديلات الهيئة سواء باستخدام محلول الاستخلاص أو محلول كلوريد الصوديوم فزيادة وزن العينة إلى ٢ جم أو ٣ جم مع تطبيق طريقة الشركة بالضبط رفع القدرة على الكشف عن آثار لحم الخنزير إلى تركيز ١ فى الخمسة آلاف بوضوح تام بدلاً من ١ فى الألف التى تم التوصل إليها باستخدام ١ جم عينة فقط .

طبقاً لما أوردته الشركة فإنها تستخدم لحساب القيمة الحدية Catoff value فى مختبراتها عمل حساسية قدره ٢,٥ أى أن أى قيمة امتصاص للعينة لا تعتبر موجبة إلا إذا ارتفعت إلى ضعفين ونصف لمتوسط قيم الامتصاص للضوابط السالبة Negative cont ولكن ولارتفاع الحساسية الشديدة لمجموعات الكشف التى استخدمها فريق العمل فإن عامل الحساسية عند حسابه أساس تركيز آثار خنزير فى الألف (وهو الذى أعطى نتائج واضحة تماماً) أعطى عامل حساسية يزيد على ٦ أى أن قيمة الامتصاص معينة الملوثة بلحم الخنزير حتى ١ فى الألف تزيد على ستة أضعاف متوسط قيم الامتصاص للضوابط السالبة وهذا يدل دلالة واضحة على أن مجموعات الكشف المستخدمة جيدة جداً وسبب ذلك قد يعود إلى عدة عوامل منه حرص الشركة على إرسال مجموعات جيدة إلى المملكة . ولحرص المملكة منيع العقيدة الإسلامية على الحصول على أدق الطرق للكشف عن لحم ودهن الخنزير من ناحية أخرى هذا بالإضافة إلى عمليتين آخرين وهما النقل السريع والسليم والتخزين الجيد لهذه المجموعات فى ثلاجة الهيئة مما يحافظ على سلامتها .

ومما سبق يمكن استخدام طريقة كورتنكس الانجليزية وضع التعديلات التي استنبطها فريق العمل للكشف عن آثار لحم ودهن الخنزير في اللحوم ومنتجاتها غير المعاملة حرارياً حتى تركيز واحد في المليون بوضوح تام .

مخطط رقم ١ :

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
Kit + (Pig) Positive Control (P +)	٣,٤٣٦	√	√
Kit + (Cow) Negative Control (C +)	٠,٢٠١	√	√
Kit + (Horse) Negative Control (H +)	٠,٢١٨	√	√
لحم بقر ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,١٩٩	√	√
لحم غنم ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,٢٣٣	√	√
لحم جمل ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,٢١٧	√	√
لحم دجاج ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,١٦٣	√	√
لحم أرانب ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,٢٤٣	√	√
لحم سمك ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,١٣٦	√	√
فول صويا ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٠,١٨٣	√	√
لحم خنزير ١٠٠ ٪ تم الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٣٠٣٠٦	√	√
لحم خنزير ١ ٪ في لحم بقر الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٣٠٢٥٢	√	√
لحم خنزير ٥ ٪ في لحم بقر الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	٣٠٢١٧	√	√
لحم خنزير ١ ٪ (١ في الألف) في لحم بقر الكشف عنه طبقاً لطريقة الشركة	١٠٢٣٥	√	√
مستخلص لحم خنزير مخفف بمحلول ملحي إلى ١ ٪ طبقاً لطريقة الشركة	٣٠٢٩١	√	√
مستخلص لحم خنزير مخفف بمحلول ملحي إلى ١ ٪ (١ في الألف) طبقاً لطريقة الشركة	٠,٤٧٣	√	√

حساب النتائج :

$$(M. N. C) \text{ Mean of negative control} = \frac{(C-) + (H-)}{2}$$
$$0,2095 = \frac{0,218 + 0,201}{2}$$

قيمة عامل حساسية الـ Kit طبقاً لشركة كورتكس

$$F = 2,5$$

القيمة الحدية (Cut off value)

$$F \times \text{متوسط امتصاص السالبة} =$$

$$0,524 = 0,2095 \times 2,5 =$$

∴ كل قيمة امتصاص تساو أو تزيد على 0,524 بها آثار لحم وخنزير .

١ - قيم الامتصاص الموجبة عالية جداً مما يدل على شدة حساسية الـ Kit .

٢ - قيم الامتصاص السالبة منخفضة مما يدل على عدم ظهور تفاعلات ثانوية .

٣ - العينة رقم ١٦ سالبة رغم ارتفاع قيمة الامتصاص لأنه تم تخفيف المستخلص بالمحلول الملحي وليس باللحم مباشرة فأصبحت آثار لحم الخنزير أقل من قدرة الـ Kit طبقاً لطريقة الشركة .

مخطط رقم : ٢ (جميع العينات تم الكشف عنها طبقاً لطريقة الشركة) :

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
Kit (Pig) Positive Control (P +) ضمن محتويات الـ Kit	٣,٣٤٧	√	√
Kit (Cow) Negative Control (C +) ضمن محتويات الـ Kit	٠,١٩٩		
Kit (Horse) Negative Control (H +) ضمن محتويات الـ Kit	٠,٢٢٩		
١ % شحم خنزير خام في لحم بقر	٣,٤١١	√	
١, ٠ % (واحد في الألف) شحم خنزير خام في لحم بقر	١,٧٤١	√	
١ % لحم خنزير قديم (محفوظ في التجميد) في لحم بقر	٣,٨٧٠	√	
١, ٠ % (واحد في الألف) لحم خنزير قديم (محفوظ في التجميد) في لحم بقر	٠,٩٧٤	√	
محلول ملحي فقط من المستخدم في التخفيف طبقاً لطريقة الشركة	٠,٢٠٨		√
لحم مفروم من شركة وان كننج انتاج ١٩٩٠ انتاج الدينمارك	٠,٤٩٧		√
بيف برجر من شركة وان كننج انتاج ١٩٩٠ انتاج الدينمارك	٠,٦٩٣	√	
يرجر مشوى من شركة وان كننج انتاج ١٩٩٠ انتاج الدينمارك	٢,٠٩٦	√	
سلامي من شركة وان كننج انتاج ١٩٩٠ انتاج الدينمارك	٣,٢٥١	√	
أقراص كفته من شركة وان كننج انتاج ١٩٩٠ انتاج الدينمارك	٣,٦١١	√	
بيف برجر من شركة وان كننج انتاج أمبورج ١٩٩٠ انتاج الدينمارك	٣,٤٨٤	√	
فطيرة لحم ديك رومي انتاج شركة جلاترجس بالنمسا	٠,٢٠٢		√
اليومين انسان تركيز ٥ %	٠,٢١٨		√

حساب النتائج :

$$\text{متوسط العينات الضابطة السالبة} = \frac{(C-) + (H-)}{2}$$
$$0,214 = \frac{0,229 + 0,199}{2}$$
$$\text{القيمة الحدية} = 0,214 \times 2,5 = 0,535$$

أى أن كل قيمة امتصاص تساوى أو تزيد على 0,535 بها آثار لحم خنزير

ملاحظات :

١ - الكت قادرة على الكشف عن شحم الخنزير أى دهن الخنزير الخام (معاملة ٤ ، ٥) .

٢ - تقل قيمة الامتصاص لآثار لحم الخنزير قليلاً إذ خزنت العينة لعدة سنين وذلك لفقد كمية من البيومين الخنزير (قارن معاملة ٧ أعلاه ، معاملة ١٤ فى التخطيط رقم ١ السابق) .

٣ - أعطيت جميع العينات الدينماركية نتيجة موجبة (المعاملات ١٠ ، ١١ ، ١٢ ، ١٣ ، ١٤) عدا اللحم المفروم (معاملة ٩٠) وقد يكون السبب فقد البيومين الخنزير بطول المدة ولأن اللحم المفروم لا توجد به مواد مضافة قد تعمل كعامل حفظ .

مخطط رقم : ٣ (جميع العينات تم الكشف عنها طبقاً لطريقة الشركة) :

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
Kit Positive Control (P +) ضمن محتويات الـ Kit	٣٠٦٩٢	√	
Kit Negative Control (C +) ضمن محتويات الـ Kit	٠,١٩٦		√
Kit Negative Control (H +) ضمن محتويات الـ Kit	٠,٢١٩		√
١ % خنزير (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	٣,٣٩٨	√	
١ % خنزير (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	٣,٤٨٠	√	
١ % خنزير (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	٣,٢٥٢	√	
٥, ١ % خنزير (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	٤,٠٥٦	√	
٥, ١ % خنزير (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	٣,٣١٣	√	
٥, ١ % خنزير (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	٣,٤٩٥	√	
١, ١ % خنزير (واحد في الألف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	١,٥٩٥١	√	
١, ١ % خنزير (واحد في الألف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	١,٣٨٠	√	
١, ١ % خنزير (واحد في الألف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	١,٤٤٣	√	
٥, ٠ % خنزير (واحد في الألفين) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	٠,٨٠٨	√	
٥, ٠ % خنزير (واحد في الألفين) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	١,١٨٣	√	
٥, ٠ % خنزير (واحد في الألفين) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	١,١٩٨	√	
٢, ٠ % خنزير (واحد في خمسة آلاف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	٠,٤٩٧		√

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
٠.٢ , % خنزير (واحد في خمسة آلاف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	٠,٥٥٠	✓	
٠.٢ , % خنزير (واحد في خمسة آلاف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	٠,٥٣٩	✓	
٠.١ , % خنزير (واحد في العشرة آلاف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	٠,٤١١		✓
٠.١ , % خنزير (واحد في العشرة آلاف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	٠,٢٨٩		✓
٠.١ , % خنزير (واحد في العشرة آلاف) (مخلوط ٣ شحم : ٧ لحم) في بقر	٠,٣٧٩		✓
مقائن فرانكفورت من شركة أمبورج انتاج ١٩٩٢	٠,١١٢		✓
بيف برجر من شركة أمبورج انتاج ١٩٩٢	٠,١٣٧		✓
بيف برجر من شركة باريكيو انتاج ١٩٩٢	٠,١٥٨		✓
شرائح بقر مفروم من شركة ونديز انتاج ١٩٩٢	٠,١١٧		✓
لحم سجن عجل صغير Sausage من شركة الزامل انتاج ١٤١٣ هـ	٠,١٩٣		✓
شرائح لحم ديك رومي مدخن انتاج ١٩٩٣	٠,١٥٨		✓
كفته بقر انتاج شركة ساريا انتاج ١٩٩٢	٠,١٦٨		✓
Veal Beff Bacon مدخن ٢٣٦ ج	٠,١٣١		✓
فليه عجل ٧٥٤ ج	٠,١٢١		✓
عجل صغير انتاج هولندا	٠,١٦١		✓
سندوتش من السوق	٠,١٥٣		✓

$$\frac{(C-) + (H-)}{2} = \text{متوسط العينات الضابطة السالبة}$$
$$\therefore 2.75 = \frac{.196 + .219}{2}$$
$$\text{القيمة الحدية} = 2.5 \times .2075 = .519$$

أى أن كل قيمة امتصاص تساوى أو تزيد على ٠,٥١٩ بها آثار لحم خنزير

ملاحظات :

١ - قدرة الكت على الكشف طبقاً لطريقة الشركة بالضبط تصل بصفة أكيدة إلى الكشف عن آثار خنزير بالعينة تركيزها ١ , % أى واحدة فى الألفين أو ٢ , % أى واحدة فى الخمسة آلاف فقد تكون موجبة ولكن غير شديدة الوضوح أما بالنسبة تركيز ١ , % أى واحد فى العشرة آلاف فلا قدرة لها عليه .

٢ - العينات رقم ٢٢ إلى ٣٢ أحضرها بعض أفراد فريق العمل من وزارة التجارة بمعرفتهم ولم يظهر آثار خنزير فى أى عينة منها .

مخطط رقم ٤ : تم الكشف عن العينات فى هذا المخطط كما يلى :

١ - العينات أ (من رقم ٣ : ٢٦) :

تم الكشف عنها طبقاً للتطوير الذى أدخله المختبر الغذائى كاملاً بالهيئة .

٢ - العينات ب (من رقم ٢٧ إلى ٤٢) :

تم الكشف عنه طبقاً للتطوير الذى أدخله المختبر الغذائى كاملاً فيما عدا استخدم المحلول الملحي الذى أوصت به الشركة بدلاً من محلول الاستخلاص الذى ابتكره المختبر الغذائى بالهيئة .

٣ - العينات جـ (من رقم ٤٨ إلى ٢٥٦) :

تم الكشف عنها طبقاً لطريقة لشركة تماماً فيما عدا زيادة وزن العينة كما هو بين أمام كل منها في الجدول .

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
(C +) Negative Control (Cow) ضمن محتويات المجموعة	٠,٢٠٤		✓
(H +) Negative Control (Horse) ضمن محتويات المجموعة	٠,٢٣٠		✓
محلول الاستخلاص الذي ابتكره المختبر الغذائي	٠,١٩٥		✓
محلول الاستخلاص الذي ابتكره المختبر الغذائي	٠,١٩٨		✓
محلول الاستخلاص الذي ابتكره المختبر الغذائي	٠,١٨٩		✓
لحم بقرى نقى ١٠٠٪ فى محلول استخلاص	٠,١٩٧		✓
لحم بقرى نقى ١٠٠٪ فى محلول استخلاص	٠,١٩٤		✓
لحم بقرى نقى ١٠٠٪ فى محلول استخلاص	٠,٢٠٤		✓
لحم خنزير ٠,١٪ (واحد فى الالف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٥٢٣	✓	
لحم خنزير ٠,١٪ (واحد فى الالف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٥٨٩	✓	
لحم خنزير ١,٠٪ (واحد فى الالف) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٣٨٥	✓	
لحم خنزير ٠,٥٪ (واحد فى الالفين) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٣٤٦	✓	
لحم خنزير ٠,٥٪ (واحد فى الالفين) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٥٤٤	✓	
لحم خنزير ٠,٥٪ (واحد فى الالفين) فى لحم بقر فى محلول استخلاص	٣,٦٠٣	✓	

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
لحم خنزير ٢, % (واحد في خمسة آلاف) في لحم بقر في محلول استخلاص	٣,٤٩٧	✓	
لحم خنزير ٢, % (واحد في خمسة آلاف) في لحم بقر في محلول استخلاص	٣,٥١١	✓	
لحم خنزير ٢, % (واحد في خمسة آلاف) في لحم بقر في محلول استخلاص	٣,٣١٣	✓	
لحم خنزير ٠,١ % (واحد في العشرة آلاف) في لحم بقر في محلول استخلاص	٣,٢٢٨	✓	
لحم خنزير ٠,١ % (واحد في العشرة آلاف) في لحم بقر في محلول استخلاص	٣,٣٠٥	✓	
لحم خنزير ٠,١ % (واحد في العشرة آلاف) في لحم بقر في محلول استخلاص	٤,٠٥٣	✓	
لحم خنزير ٠,٠١ % (واحد في المائة ألف) في لحم بقر في محلول استخلاص	٣,٢٧٠	✓	
لحم خنزير ٠,٠١ % (واحد في المائة ألف) في لحم بقر في محلول استخلاص	٣,٨٤٧	✓	
لحم خنزير ٠,٠٠١ % (واحد في المائة ألف) في لحم بقر في محلول استخلاص	٣,٢١٩	✓	
لحم خنزير ٠,٠٠٠١ % (واحد في المليون) في لحم بقر في محلول استخلاص	٣,٤١٩	✓	
لحم خنزير ٠,٠٠٠١ % (واحد في المليون) في لحم بقر في محلول استخلاص	١,٤٢١	✓	
لحم خنزير ٠,٠٠٠١ % (واحد في المليون) في لحم بقر في محلول استخلاص	١,٢٩٠	✓	

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
لحم بقر نقى ١٠٠ ٪ فى محلول ملحي	٠,١٦٥		✓
لحم بقر نقى ١٠٠ ٪ فى محلول ملحي	٠,١٦٢		✓
لحم بقر نقى ١٠٠ ٪ فى محلول ملحي	٠,١٧١		✓
لحم بقر نقى ٠,١ ٪ (واحد فى الالف) فى لحم بقر محلول ملحي	٣,٢٧٨	✓	
لحم بقر نقى ٠,١ ٪ (واحد فى الالف) فى لحم بقر محلول ملحي	٣,٣٩١	✓	
لحم بقر نقى ٠,١ ٪ (واحد فى الالف) فى لحم بقر محلول ملحي	٣,٦٠٦	✓	
لحم بقر نقى ٠,٥ ٪ (واحد فى الالفين) فى لحم بقر محلول ملحي	٣,٧٧	✓	
لحم بقر نقى ٠,٥ ٪ (واحد فى الالفين) فى لحم بقر محلول ملحي	٣,٤٣٤	✓	
لحم بقر نقى ٠,٥ ٪ (واحد فى الالفين) فى لحم بقر محلول ملحي	٣,٨٤٥	✓	
لحم بقر نقى ٠,٢ ٪ (واحد فى خمسة آلاف) فى لحم بقر محلول ملحي	٣,٣٧١	✓	
لحم بقر نقى ٠,٢ ٪ (واحد فى خمسة آلاف) فى لحم بقر محلول ملحي	٣,٥٠٨	✓	
لحم بقر نقى ٠,٢ ٪ (واحد فى خمسة آلاف) فى لحم بقر محلول ملحي	٣,٣٤٦	✓	
لحم بقر نقى ٠,١ ٪ (واحد فى العشرة آلاف) فى لحم بقر محلول ملحي	٣,٣٢٠	✓	

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
لحم بقر نقى ٠,١ ٪ (واحد في العشرة آلاف) في لحم بقر محلول ملحي	٣,٦٨٦	✓	
لحم بقر نقى ٠,١ ٪ (واحد في العشرة آلاف) في لحم بقر محلول ملحي	٣,٩١٠	✓	
لحم بقر نقى ٠,٠٠١ ٪ (واحد في المائة ألف) في لحم بقر محلول ملحي	٣,٢١٣	✓	
لحم بقر نقى ٠,٠٠١ ٪ (واحد في المائة ألف) في لحم بقر محلول ملحي	٣,٢٤٣	✓	
لحم بقر نقى ٠,٠٠١ ٪ (واحد في المائة ألف) في لحم بقر محلول ملحي	٣,١٧٢	✓	
لحم بقر نقى ٠,٠٠٠١ ٪ (واحد في المليون) في لحم بقر محلول ملحي	٠,٨٤٣	✓	
لحم بقر نقى ٠,٠٠٠١ ٪ (واحد في المليون) في لحم بقر محلول ملحي	٠,٨٧٧	✓	
لحم بقر نقى ٠,٠٠٠١ ٪ (واحد في المليون) في لحم بقر محلول ملحي	٠,٩١٠	✓	
٢ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحي إلى ٠,١ (واحد في الألف) طبقاً للشركة	٣,٢٧٠	✓	
٢ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحي إلى ٠,٠٥ (واحد في الألفين) طبقاً للشركة	١,٧٠٥	✓	
٢ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحي إلى ٠,٠٢ (واحد في الخمسة آلاف) طبقاً للشركة	٠,٩١٦	✓	

نوع العينة	الامتصاص	يوجد لحم خنزير	لا يوجد لحم خنزير
٣ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحي إلى ٠.١ (واحد في العشرة آلاف) طبقاً للشركة	٠,٥٥٥	√	
٣ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحي إلى ٠.١ (واحد في الألف) طبقاً للشركة	٣,٤٠٦	√	
٣ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحي إلى ٠.٥ (واحد في الألفين) طبقاً للشركة	١,٧٧٨	√	
٣ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحي إلى ٠.٢ (واحد في الخمسة آلاف) طبقاً للشركة	١,٣٩٥	√	
٣ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحي إلى ٠.١ (واحد في العشرة آلاف) طبقاً للشركة	٠,٧٨٦	√	
٣ مم عينة لحم خنزير وتخفيف بمحلول ملحي إلى ٠.١ (واحد في العشرة آلاف) طبقاً للشركة	٠,٧٣٤	√	

$$\frac{(C-) + (H-)}{2} = \text{متوسط العينات الضابطة السالبة}$$

$$٠,٢١٧ = \frac{٠,٢٣٠ + ٠,٢٠٤}{2}$$

$$٠,٥٤٣ = ٠,٢١٧ \times ٢,٥ = \text{القيمة الحدية}$$

أى أن كل قيمة امتصاص تساوى أو تزيد على ٠,٥٤٣ بها آثار لحم خنزير

ملاحظات :

١ - لم تستخدم الضابط الموجب (P +) Positive control (Pig) لأن فائدة

الضابط الموجب الوحيد هو إثبات أن الكت مازالت صالحة ولا تستخدم قيمة الامتصاص الناتجة عنه في الحسابات وقد استخدم في هذا المخطط ٧ شرائط سبق استخدام ٨ عينات ($٨ \times ٧ = ٥٦$) وهذه الشرائط مأخوذة من كت سبق استخدام الضابط الموجب بها وثبت صلاحيتها (الكت الواحد ١٢ شريط) تكشف على ٩٣ عينة + ٢ ضابط موجب أى ٩٦ ($٨ \times ١٢ = ٩٦$).

٢ - عينات محلول الاستخلاص فقط (٣ «أ» ، ٤ «أ» ، ٥ «أ») أعطت نتيجة سالبة بوضوح .

٣ - عينات لحم البقر النقي ١٠٠ ٪ في محلول استخلاص طبقاً للطريقة التي ابتكرها المختبر أعطت نتيجة سالبة بوضوح .

٤ - عينات لحم البقر النقي ١٠٠ ٪ في محلول ملحي فقط طبقاً للطريقة التي ابتكرها المختبر أعطت نتيجة سالبة بوضوح وقد سبق أن أعطى المحلول الملحي فقط في مخطط رقم ٢ عينة ٨ نتيجة سالبة أيضاً .

٥ - عينات لحم الخنزير حتى تركيز واحد في المليون طبقاً للطريقة التي ابتكرها المختبر سواء مع استخدام محلول الاستخلاص (عينات ٢٥ «أ» ، ٢٦ «أ» ، ٧ «أ») أو باستخدام محلول ملحي (عينات ٤٥ «ب» ، ٤٦ «ب» ، ٤٧ «ب») أعطت جميعها نتيجة موجبة ولو أنها كانت واضحة جداً باستخدام محلول الاستخلاص الذي ابتكره المختبر عن المحلول الملحي الذي أوصت به الشركة .

٦ - الفارق بين عينات لحم البقر ١٠٠ ٪ ولحم البقر الملوث بأى آثار للخنزير حتى جزء واحد في مليون جزء من لحم البقر على جميع المستويات كان كبيراً جداً وواضح مما يسهل حتى التفرقة بينهما في نهاية التجربة بالعين

المجردة دون الاعتماد على قياس الامتصاص الضوئي لها باستخدام
Microplate reader .

٧ - استخدام وزنات أكبر من العينة (٢ مم ، ٣ مم) عما يستخدم لطريقة
الشركة (١ مم) يؤدي إلى القدرة على الكشف حتى واحد في الخمسة
آلاف آثار لحم الخنزير .

المناعة الكيميائية فى الكشف عن
لحوم الاغنام والخنزير والخيـل
فى منتجات لحوم الابقار
بالامصال المضادة لميوجلوبين هذه الحيوانات

Hayden, A. R.: Immuno chemical Detection of ovine, porcine and Equine Flesh in beef products, with Antisera to species Myoglobin. J. of food science - vol. 44. No.2 (1979)

المناعة الكيميائية فى الكشف عن لحوم الأغنام والخنزير والخيل فى منتجات لحوم الأبقار بالأمصال المضادة لميوجلوبين هذه الحيوانات

أساس الطريقة:

الأمصال المضادة للميوجلوبين المعزول من لحوم الأغنام والخنزير والخيل تستخدم فى الكشف عن لحوم هذه الحيوانات بطريقة الانتشار فى الآجارجيل .

تحضير الميوجلوبين:

يحضر ميوجلوبين الأغنام والخنزير والأبقار من قلوبهم (Awad & Kotite 1970, Atassi et al 1966)) وهى باستخلاص الميوجلوبين من المستخلصات المائية لعضلات قلوب الحيوانات السابق ذكرها بواسطة الديليزة فى ١٠٠ ٪ محلول مركز من $(NH_4)_2 SO_4$ بعد إزالة الهيموجلوبين وبروتينات الساركوبلازما بواسطة محلول سب أسيتات الرصاص (٢٠ ٪)، فوسفات البوتاسيوم 1.65 $(MKH_2 PO_4 & 1.35 MK_2 HPO_4)$ ، ٧٠ ٪ من محلول مركز من $(NH_4)_2 SO_4$. قبل استخدام الناتج، ومستحضرات الميوجلوبين والمديليزة ضد الماء حتى خلوها من السلفات ($Ba Cl_2$ test)، المجففة بالتجمد ومحفوظة عند درجة حرارة - ٢٠ °س (يحضر ميوجلوبين الخيل من لحومها).

تحضير الاتيجين:

١- يؤخذ ٦٦ جرام محلول ميوجلوبين من لحوم كل من الخيل والأبقار والأغنام (حولى) وتوضع على محلول محايد للفوسفات (أس هيدروجينى

(٦,٨).

٢- يسخن المحلول عند درجة ٩٠ س لمدة ١٥ دقيقة.

٣- سيظل بعض المواد غير القابلة للذوبان فى محاليل ميوجلوبين الأغنام (حوالي) والأبقار لم تخرج من المحلول.

٤- كل محلول من الانتيجن يتحد كاملا مع ١٠ ملل من محلول فرونيدي Freund,s adjuvant مذابا فى پى تى - ١٠ بولى ترون (PT-10 Poly-tron)، ولزيادة قوة الانتيجن يرسب بروتينه بواسطة الألومنيوم (I N NaOH) (1943) ويعكر بواسطة واحد إن صوديوم هيدروكسيد (I N NaOH) ويستخدم المحلول بدون إزالة العكارة بواسطة جهاز الطرد المركزى، ويغسل من الرواسب.

الامصال المضادة Antiseora

١- مجموعات من الأرانب كل منها ٣ أرانب تستخدم كعائل وسيط لميوجلوبينات الحيوانات. كل مجموعة تحقق أسبوعيا لمدة خمسة أسابيع بالانتيجن المحتوى على الميوجلوبين من لحوم الخيل وعضلة قلب كل من الحملان والبقر (٠,٦١ ملل) (كل مجموعة خاصة بنوع واحد من الحيوانات) فى وسادة قدم الخوافر (٠,٣ ملل / وسادة حافر)، ٠,٥ ملل تحت الجلد (٠,١ ملل / مكان) على ظهر القفص الصدرى.

٢- تنزف الأرانب أسبوعيا من الوريد الأذنى بعد كل نزفة يعطى واحد ملل راسب الألومنيوم الانتيجنى فى البريتونيوم، واحد ملل فى الوريد.

٣- يجمع الدم فى أنابيب جهاز الطرد المركزى سعة ٥٠ ملل وتترك حتى التجلط عند درجة حرارة ٢٥° س لمدة ثلاث ساعات ويترك عند درجة

حرارة ٤° س طول الليل وتدور فى جهاز الطرد المركزى عند ١٠,٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ٢٠ دقيقة.

٤- تحفظ الأمصال المضادة عند درجة حرارة -١٥° س فى محلول مرثيولات (١: ١٠,٠٠٠) كمادة حافظة.

٥- يجفف بالتبريد مضاد مصل الماعز لميوجلوبين الخنزير المتحصل عليه من Coppel Laboratories وذلك لاحتوائه المنخفض لمضادات الأجسام Antibody، والأمصال المضادة لميوجلوبين الخنزير (٢ ملل مجففة بالتجميد) تخفف بواسطة ٥ ملل ماء مقطر محتوية على ٠.٢ ٪ صوديوم أزيد كمادة حافظة.

٦- الحلقة الإيجابية للجسم المرسب تحتوى على ١,١٦ - ١,٣٢ من تخفيفات الأمصال المضادة.

الامتصاص المناعى لمضادات الأمصال لميوجلوبين للأغنام:

(Immunoabsorption of anti-lemb myoglobin antiserum).

- محاولة إيقاف التدخلات التفاعلية لمضادات الأمصال من الأمصال المضادة لميوجلوبين الأغنام بواسطة الامتصاص المناعى بالميجلوبين البقرى المقرون بالاجاروز غير الذائب والممتص بواسطة لحوم البقر الطازجة. العيار الحجمى لباقي مضادات الأجسام أصبح منخفض التأثير فى الجسم المقاوم المرسب للتحليل. نجاح الامتصاص المناعى بتجفيف مستخلصات اللحوم بالتجميد كما شرحت سابقًا (warnecke & saffle 1968b)

- يوزن ٩٠.٢ جرام من لحوم البقر المقرومة الطازجة ويوضع حجم مساوى من الماء عند درجة حرارة ٤°س عليها لمدة ٢٤ ساعة ثم تدور فى جهاز

الطرد المركزي عند ١٠٢٠ لفة في الدقيقة لمدة ٣٠ دقيقة.

- يؤخذ السائل الطافي ويجمد بالتجفيف ويحفظ عند -١٥°س مقسم إلى أجزاء كل منها ١٠-١٥ ملم لاستخدامها في امتصاص ٢ ملل من مضادات الأغنام لمضادات الأمصال لإزالة مضادات الأجسام لميوجلوبيين لحوم الأبقار. الأمصال المضادة لخليط مستخلص لحوم الأبقار يحضن في درجة الغرفة العادية لعدة ساعات ثم في درجة حرارة ٤° طول الليل ثم يدور في جهاز الطرد المركزي .

- يحضر اس دي اس - الهجرة الكهربائية للاكريلامين جيل (Lee et al) (1974).

- يحضر السجق (مقاتق) ومستخلصاته (Hyden 1977)

- الهجرة الكهربائية للمناعة (Immuno electrophoresis) Hyden, 1977 (experiments يوضع الأجار ١٪ في او. إم محلول باربيتال (اس هيدروجيني ٨, ٤) بمدة انفصال ٥, ٠ ساعة عند العمل حتى يبقى بروتين اللحوم سالب الشحن وقابلية التحرك أكبر من الألبومين على الشريحة.

التعليق: (النتائج)

- الهجرة الكهربائية للدقاتق المعلقة لعديد الأكريلاميد (شكل ١) (Polyacrylamide Electrophorsis)

- الشكل الأول يدل على أن الهجرة الكهربائية متحركة في ميوجلوبيين لحوم عضلات القلب للبقر (B) والغنم (L) تشبه حركة لميوجلوبيين لحوم الخيل. النتائج (لم ترى) المشابهة لميوجلوبيين عضلات قلب الخنزير. الوزن الجزيئي متماثل بوضوح. العالم لينينجر ١٩٧٥ (Lehninger 1975) وجد أن الوزن

الجزئى لميوجلولين لحوم عضلات قلب الخيل ١٦,٩٠٠ كما أن العالمان ساتيرل وأشاريا ١٩٧٢ (satterle and zachariah) وجدوا أن الوزن الجزئى لميوجلولين الغنم ١٧,٧٥٣ وللختزير ١٧,١٤٢.

- ميوجلولين اللحوم وعضلات القلب مفروض أن تتشابه فى المناعة. العالمان كاجان وليندر ١٩٦٨ (Kagan & Linder 1968) لم يجدوا اختلافاً فى المناعة بين ميوجلولين عضلات القلب واللحم فى البط. العالمان كاجان وجروفيش ١٩٦٧ (Kagan & Gurevich, 1967) وجدوا أن ميوجلولين عضلات القلب واللحم فى الإنسان متطابقة فى تفاعلات أجار جيل الترسيبية مع مضادات الأجسام فى الأرناب لميوجلولين عضلات الإنسان.

- الاختلاف الذاتى الصغير تمت رؤيته فى ميوجلولين من عديد المصادر. تحضير ميوجلولين لحوم الخيل يحلل إلى ثلاث مركبات متجانسة (Lewis & Schweigert, 1955)، (Akeson & Theorell, 1960)، (Perkoff et al., 1962) عزلت ٤ مركبات هيماتين ملائمة من ميوجلولين الإنسان بواسطة كروماتوجراف السيلولوزى DEAE (المركبات المختلفة لم تبحث).

- تحضير اثنين من مضادات الأجسام للأرناب من ميوجلولين الغنم تم تحضيره إلى حد كبير من تداخل التفاعلات (شكل ٢). مستخلص لحوم البقر توضع فى جميع الحفر ويتوقع حدوث تفاعلات داخلية مع لحوم البقر وهذه تعضد بواسطة انتشار ثنائى فى التجربة وأعلى الحفر كما فى شكل ٢ يحتوى على سجون بقرى مغشوش بـ ١.٥٪ لحوم خيل وضع مكان محلول ميوجلولين الخيل، لم يحدث ترسيب، ميوجلولين لحوم البقر يدل ضمناً على التفاعل فى حفر البقر والمختزير فى هذا الوقت.

- تداخل التفاعل للمناعة الكيميائية بين أنواع الميوجلولين ثم دراستها. كاجان وليندر ١٩٦٨ (Kagen & Linder 1968) وجدوا التفاعلات متطابقة بين

الأمصال المضادة لميوجلويين البط والحمام والدجاج وهى أجناس لها علاقة قريبة من بعضها، أتاسى وآخرون ١٩٧٠ (Atassi et al 1970) وجدوا التفاعلات الترسيبية للأجار جيل متماثلة بين الأمصال المضادة لميوجلويين الإنسان والقرود والجمل والفرس. التفاعل الترسيبى بالأمصال المضادة لميوجلويين الماعز يشير إلى أن ميوجلويين الأغنام والأبقار لها ٩٠٪ من تأثير ميوجلويين الماعز.

● نتائج تفاعلات الأجار جيل بين كميات ثابتة لميوجلويين لحوم البقر والأمصال المضادة لميوجلويين الأغنام سابقة الامتصاص بكميات متدرجة من مستخلص لحوم الأبقار المخفف بالتجميد كما هو مبين فى شكل ٣. إزالة التداخل التفاعلى لمضادات الأجسام يشير إلى نقص كثافة خطوط الترسيب عند امتصاص الحفر ٥٠ ملجم من المستخلص الجاف/ ٢ ملل.

● شكل ٤ يوضح تفاعلات الأجار جيل بين ميوجلويين الأغنام ومضادات الأمصال لميوجلويين الأغنام المتص سابقاً بكميات متدرجة من المستخلص الجاف للحوم البقر.

التفاعلات الترسيبية قوية حتى للحفر التى تحتوى على الأمصال المضادة لميوجلويين الأغنام (Anti - LMP Serum) امتصت سابقاً بـ ٥٠ ملجم لحوم بقرية/ ملل.

هذه النتائج تدل على أن مضاد المصل الأحادى التخصيص (المحدد) يمكن تحضيره بالامتصاص المناعى بواسطة التقدير أو التعيين السابق لكميات مستخلصات اللحوم المائية الجافة بالتجميد من التفاعل الداخلى للأنواع، ويعتقد أن هذه النتائج ممكن استخدامها فى كميات مركبة لمستخلصات مجففة بالتجميد لعديد من الأنواع لإزالة مضادات الأجسام بعديد من التفاعلات الداخلية من الأمصال المضادة. بيتو ١٩٦١ (Pionto 1961) وجد أن امتصاص ١ : ٢٠٠

محلول ملحي مخفف من الأمصال المضادة للأرانب ضد مصل الثور بالتقدير الحجم المسبق من أمصال الجاموس والماعز والغزال لتحضير مضاد المصل المحدد ضد مصل الثور. الامتصاص مع مجموعة من الأمصال المجففة بالتجميد لهذه النوعيات يجب أن تكون بطريقة مبسطة.

● شكل ٥ يبين التفاعلات المترسبة على الأجار جيل بمضاد مصل الأرانب لميوجلوبين الأغنام المتص سابقاً بواسطة مستخلص لحوم البقر المجفف بالتجميد. الخطوط المترسبة تدل على التماثل المتاعى بين ميوجلوبين الأغنام المعزول والميوجلوبين فى المستخلصات ٥ ، ٣٪ من لحوم الغنم المغشوشة بها لحوم البقر المفرومة. الخط التماثل الممتد من مضادات الأمصال لميوجلوبين الأغنام يمكن تعيينها (تقديرها) فى اللحوم البقرية الطازجة المفرومة حتى ٣٪. ميوجلوبين مستخلص لحوم الأبقار لا يتفاعل بامتصاص الأمصال المضادة.

● خواص الهجرة الكهربائية (electrophoretic) والكيمياء المناعية (immunochemical) لميوجلوبين الخنزير المختبر والمشروح سابقاً.

● نتائج شكل ٦ ثابت فى معمل Coppel (لم يرى) ويدل على مساحة الترسيب تظهر فى منطقة الجلوبيولين (globulin) للإلكتروليت فورنوجرام (electrophoretograms) المتكون بالأمصال المضادة والمحضرة لميوجلوبين لحوم الخنزير. الفصل بعد $\frac{1}{4}$ ساعة لحماية الفاقد من أى مركب من الميوجلوبين المحضر أو للخنزير المخلوط مع لحوم البقر بنسبة ٢٥٪ (B, 25% p). هذا قد يكون Mobility أكبر من الألبومين.

النتائج تدل على عزل الميوجلوبين من الهجرة الكهربائية التى لها خواص مناعية تشابه مركب لحوم الخنزير المخلوط (مغشوش) به لحوم بقرية (B, 25%).

شكل ٧ يبين السهجرة الكهربائية المناعية والتي تماثل فى سرايائها شكل ٦ ولكنها مكونة بالأمصال المضادة لمصل الخنزير. هذه النتيجة والموجود فى شكل ٦ تدل على الأمصال المضادة لميوجلوبين الخنزير محتوى على مضادات الأجسام للجلوبولين لحوم الخنزير (instead) بدلاً من مصل جلوبولين الخنزير.

شكل ٨ يبين تفاعل depicts الأجار - جيل المترسب بين المصل المضاد للماعز لميوجلوبين الخنزير (ANTI - PMI Serum) ومستخلصات اللحوم البقرية واللحوم البقرية المغشوشة بـ ٣-٥٠٪ لحوم خنزير. النتيجة تدل على وجود ثلاث خطوط مترسبة فى الخضم عند تركيز ٥٠٪ لحوم بقرية وأما ظهور خطان مترسبان فى الحفر يدل على أن اللحوم البقرية مغشوشة بلحوم الخنزير. وغياب خطوط الترسيب فى حفر اللحوم البقرية (B, 100%) يدل على نقص فى التطابق بين ميوجلوبين الفصيلة البقرية وميوجلوبين الخنزير.

شكل ٩ يبين تفاعلات الأجار - جيل المترسبة بين الأمصال المضادة للماعز إلى ميوجلوبين الخنزير ومحلول مستخلصات الأبقار المفرومة والمجففة بالتبريد (B, 100%)، ولحوم الأبقار المفرومة والمغشوشة بلحوم الخنزير (B, 1% - P)، وميوجلوبين الخنزير (P, Mb) النتائج تدل على عدم وجود تفاعلات تداخلية بين ميوجلوبين الخنزير (p, Mb) ميوجلوبين الخنزير (p, Mb) يحتوى على مركبين من الناتجين واحد لم يرى identity بـ ١٠٪ مستخلص لحوم الخنزير والثانى لم يشاهد identity بغش لحوم البقر بلحوم الخنزير حتى ٣٪.

العينات المحضرة تبين فى شكل ٩ والتي عوملت بالحرارة حتى ٧٠°س لمدة ٣٠ دقيقة والمتجانسة فى ١٠٠ ملل ماء مقطر يحتوى على ٠,٢ ٪ صوديوم لؤيد. لا يوجد تفاعل إيجابى بالمستخلصات المجففة بالتجميد فى الانتشار فى الأجار - جيل حتى زيادة التركيز إلى ٨٠ ملجم/ ملل. النتائج التى تشاهد فى

شكل ١٠ الاختبارات (test) إيجابية فقط حتى مستوى ١٠٪ من الغش، والتشابه الموجود في شكل ٩، شكل ١٠ يحتاج إلى زيادة التركيزات للمستخلصات المعاملة حرارياً حتى ٨٠ ملجم/ ملل (شكل ١٠) للحصول على نتائج إيجابية دلالة على تركيز الميوجلوبين والانتيجين competence انخفاض أثناء التسخين.

خطوط الترسيب للميوجلوبين في الحفر (شكل ٩، ١٠) لا يرى identity بـ ١٠٪ مغشوشة بمستخلص لحوم الخنزير وليس من السهولة شرحها (but might represent aMb component no longer antigenically Competent in the presence of other proteins in the mixtures).

يبين شكل ١١ التفاعلات بين الأمصال المضادة للأرانب لميوجلوبين لحوم الخيل المعاملة حرارياً وغير المعاملة حرارياً، ومستخلصات اللحوم البقرية الموجودة في المقائق (السجق) والمغشوشة بـ صفر، ١، ٣، ٥٪ لحوم خيل، لا يوجد تفاعل في مستخلص لحوم البقر (BEEF) ولا يوجد تفاعل تداخل بين ميوجلوبين مستخلص لحوم البقر (BEEF) وميوجلوبين الخيل، الخطوط of identity ترى في حفر ميوجلوبين الخيل المعاملة حرارياً (H, Mb, ΔT)، ومستوى ميوجلوبين الخيل (H, Mb) وجفر مستخلصات لحوم الأبقار والمحتوية على ٥ - ٣٪ لحوم خيل لا يوجد بها اختلاف في تقدير detectable بالتفاعل الترسيبي.

نجاح تعيين أو تقدير وجود ميوجلوبين الخيل في سجق (مقاييق) لحوم الأبقار المعاملة حرارياً حتى مستوى ٣٪ غش (شكل ١١)، يحتاج إلى زيادة المستخلص حتى ٨٠ ملجم/ ملل في النظم المعاملة حرارياً بغش لحوم البقر بلحوم الخنزير للحصول على نتائج إيجابية حتى مستوى ١٠٪ غش لحوم خنزير.

وفشل تعيين ميوجلوبين الأغنام فى سجع لحوم الأبقار المعاملة حراريا قد ترجع هذه النتيجة إلى انخفاض الميوجلوبين فى لحوم الخنزير والأغنام. العالم لاور ١٩٥٠ (Lawrie 1950) وجد أن عضلة القلب وعضلة الحجاب الحاجز وعضلة لوجسمس Longissimus عضلة بسواس (Poas) للخييل تحتوى فى المتوسط على أكثر من ٤٢٪ ميوجلوبين عن الموجودة فى مثيلاتها فى الخنزير.

العالم لاور ١٩٥٣ (Lawrie) وجد على wet basis وعضلة بسواس (poas) فى الخيل تحتوى على ٧١,٠٪ ميوجلوبين، ٣٥,٠٪ ميوجلوبين فى الأغنام.

والعالم سيتى وآخرون (١٩٧٣) (Setty et al 1973) وجدوا أن لحوم الأرجل الخلفية للأبقار تحتوى على ٣٢,١ ملجم/ جم ميوجلوبين، ٧١,٠ ملجم/ جم للأغنام.

عن تركيزات أنواع البروتينات الخاصة بالاختبار إلى الحد الأقل initially low فى غش اللحوم يخفض بالمعاملة الحرارية، واستخدام مستخلصات منتجات اللحوم بالتجفيف بالتجميد والتجفيف بالتجميد للأمصال المضادة يسهل ضبط تركيز reagent لسرعة الحساسية للاختبار الترسبى للأجار - جيل.

العالم هلم وآخرون ١٩٧١ (Helm et. al (1971) وجدوا زيادة حساسية لترسيب السائل وتحليلات الأجار - جيل المترسب بواسطة عزل إميون جلوبيولين immune globulins من الأمصال المضادة للأرانب لمستخلصات لحوم الخيل والأبقار، الأغنام والخنزير. من خلال استخدام إميون جلوبيولين المعزول، لابد من تقدير approximately ٢, ملجم بروتينات/ ملل بالانتشار فى الحيل، ١٥,٠ ملجم/ ملل بروتين مغشوش بتفاعل ترسب انبوى by tube precipitin reaction استخدام التجفيف بالتجميد للأمصال المضادة وهذا ييسر التجربة.

التحليل:

التائج تدل على المحاليل المائية للميوجلوبين المعزول من لحوم الأغنام والأبقار والمعامل حراريا حتى درجة حرارة 90°C لمدة ٣٠ دقيقة لا يغير ولا يعدل بنية البروتينات تعديلا كافيا يمكن إثباته مجدداً ومختلف فى مواقع الانتيجن.

تدل التفاعلات فى (شكل ١١) بين مستخلص لحوم السجق (مقائق) البقرى المغشوش بلحوم الخيل (حفر البقر، الخيل ٥٪)، ومحلول ميوجلوبين لحوم الخيل (H, Mb) ومحلول ميوجلوبين لحوم الخيل المعامل حراريا (H, Mb, ΔT) يدل على الأجسام المضادة الموجودة فى هذا المصل ميوجلوبين. نشاط امتصاص الأمصال المضادة لميوجلوبين الأغنام المعامل بالحرارة (شكل ٥) بمستخلصات لحوم الأبقار الطازجة المفرومة والمغشوشة بلحوم الأغنام الطازجة تدل على وجود مضادات أجسام لميوجلوبين الأغنام (الحملان)، غياب مضادات الأجسام يمكن إثباتها بالمعاملة الحرارية للميوجلوبين غير متوقع وذلك لفقد الميوجلوبين لطبيعته الخاصة والتي تظهر عند درجات الحرارة المساوية والمشابهة المستخدمة فى الدراسة 90°C .

درايودت ١٩٦٩ (Draudt 1969) وجد أن ٧٥٪ من ميوجلوبين لحوم البقر المعزول يفقد طبيعته الخاصة عند درجة حرارة 90°C وفى خلايا اللحوم عند أس هيدروجينى ٥,٦ (PH 5.6) لمدة $\frac{1}{4}$ ساعة.

العالم دافيس ١٩٦٢ Davios لاحظ أن ٥٠٪ من ميوجلوبين اللحوم النقية تفقد طبيعتها عند درجة حرارة 76°C لمدة ساعة.

كورنيش ١٩٧٣ (Cornish 1973) وجد أن ٥٠٪ ميوجلوبين قونصة الرومى يفقد طبيعته عند درجة حرارة $78,5^{\circ}\text{C}$.

اليومين البيض ومصل الفصيلة البقرية والمعامل حراريا عند درجة حرارة 100° س (Furth 1925) وكذلك جاما جى جلوبيولين للإنسان تفقد طبيعتها (G globulin - 8) Henney & Ishizaka 1968 وتمتلك خواص أنتيجن جديد، ويختلف عن الانتيجين الطبيعى .

البروتين الطبيعى Native لا يرسب جميع الأجسام المضادة من الأمصال المضادة لفقد طبيعتها، البروتين المترسب لا يرسب كل الأجسام المضادة من الأمصال المضادة للبروتين الطبيعى .

دافيس (1962) وجد أن 50% من ميوجلوبيين لحوم الأبقار يفقد طبيعته عند درجة حرارة 63° س - 76° س عند تسخينه فى مستخلص اللحوم البقرية.

درايودت 1969 وجد أن 50% من الميوجلوبيين للحوم المفرومة يفقد طبيعته عند درجة حرارة 44° س - 72° س.

دافيس 1962 وجد أن ميوجلوبيين اللحوم البقرية يفقد طبيعته عند درجة حرارة 75° س أعلى بـ 10% فى وجود أوفالبيومين (الغنم) (Ovalbumin) عنها فى وجود مصل الألبومين للأبقار، اليومين الأغنام أقل تحملا للحرارة عن مصل اليومين الأبقار.

يتضح مما سبق بأن الحرارة تفقد الميوجلوبيين الموجود فى البروتينات طبيعته.

والألبومين الفاقد لطبيعته had affinity للهيماتين عنه فى الميوجلوبيين غير الفاقد لطبيعته .

• النتائج تدل على الأمصال المضادة لأنواع المستخلصات من سجن لحوم الأبقار الطازجة أو المعاملة بحرارة متوسطة واللحوم المفرومة إذا كان تركيز

الميوجلولين فى اللحوم الفاقدة لطبيعتها وكما يوجد بعض الميوجلولين الطبيعى يظل بعد التسخين .

هاشوموتو وياسى ١٩٥٧ وجدوا الميوجلولين الطبيعى للخنيل يمكن تقديره فى مستخلص لحوم الخنيل المعامل حراريا عند ٧٠ - ٨٠ °س لمدة ٣٠ دقيقة أو فى وسائل معلبات لحوم الخنيل المعاملة حراريا حتى درجة حرارة ١١٠ °س لمدة ٦٠ دقيقة . الأمصال المضادة لها ليس لها تأثير فى التحليلات الترسيبية لتعيين لحوم الخنيل فى المنتجات المعاملة حراريا حتى درجة حرارة ٨٠ °س .

ويمكن تعيين لحوم الخنيل المعلبة وتسخين منتجات اللحوم البقرية حتى درجة ١١٠ °س تستخدم فى الاختبارات immune hemolysis test for Forssman's heterophile antigen (F-antigen) .

الـ F-antigen موجود فى لحوم الخنيل والأرانب الرومى (الوبر)، والكلاب والقطط والفئران وWhale وغير موجود فى لحوم الأبقار والأرانب والخنزير والأغنام وليست خاصة بأى نوع .

● التداخل التفاعلى بين ميوجلولين لحوم الأبقار والأمصال المضادة لميوجلولين لحوم الأغنام (شكل ٢) يجوز بسبب تقنين انتيجن مشابه على جزيئات Molecules الميوجلولين الناتج من المشابه فى الحامض الأمينى Sequences فى tertiary structure للجزيئات .

هان وآخرون ١٩٧٢ وجدوا التركيب الأولى للميوجلولين لحوم عضلات قلب الأغنام يختلف عن ميوجلولين لحوم عضلات الأبقار فقط فى 6 amino acid of the 153 residues/mol .

الاختلاف ناتج من إعادة وضع Ala-9and Ala-142 بواسطة Leu-9، Met142 فى الأغنام Ala-124 فى الأبقار بواسطة Gly-124 أغنام، Glu-144

أبقار بواسطة Ala-144 أغنام، Lys-145 أبقار بواسطة Glu-145 أغنام، His-152 أبقار بواسطة His-152 أغنام. قلة التفاعل الداخلى بين مستخلص لحوم الأبقار والأمصال المضادة لميوجلوبين لحوم الخيل (شكل ١١ Well BEEF) احتمال لوجود اختلافات فى تعيينات الانتيجن بين ميوجلوبين لحوم الأبقار. وميوجلوبين لحوم الخيل وهذا ناتج من اختلافات فى primary و Thus tertiary structure. هان وآخرون ١٩٧٠ وجدوا ١٨ حامض أمينى يختلفوا Sequential بين ميوجلوبين عضلات قلوب الأبقار وميوجلوبين عضلات قلوب الخيل.

• مقدرة الأنتيجين لجزيئات لميوجلوبين فى التكيف تحت الظروف التى تسبب التغير فى المرحلة الثالثة أو التركيب.

رشلين وآخرون ١٩٦٣ (Reichlin et al 1963) أثبتوا وجود اختلافات فى أنتيجن الهيموجلوبين والميوجلوبين وانقسامات الجلوتين. فصل الجلوتين أقل من $\frac{1}{2}$ مؤثر كما هو فى الهيموبروتين الأصيل. إضافة الهيم إلى جلوتين يحفظ قوة الانتيجين.

أتاسى ١٩٦٧ (Atassi 1967) قام بتحضير ميتالو بورفيرين (metalloporphyrins) المنجنيز، الحديد، الكوبلت، نيكيل، النحاس والزنك وتركيبهم مع أبوميوجلوبين (apomyoglobin).

تحضير ميوجلوبين النحاس بالمناعة الكيميائية متطابقاً بالفرميوجلوبين (Ferrimyoglobin) الأصيل بينما الميوجلوبينات الصناعية أقل نشاطاً بدرجات مختلفة مع الأمصال المضادة للفرميوجلوبين. وبين الباحث التغيرات فى نشاط الانتيجين يرجع إلى التغيرات فى الجزيئات التى تحصل باختلاف الغرض والأهمية لمختلف المعادن.

● ظاهرة أخرى بالإضافة إلى تغيير طبيعة البروتين الأصلية هذا وقد يغير الشكل وكفاءة أنتيجن الميوجلوبين أثناء عملية الطهي للحوم وكذلك كالاتى:

(١) تغيير الفرى هيم لوسى (Ferrihem Loci) بالاختزال التأكسدى (Bemofeskyeral 1959).

(٢) التسخين يحدث اتحاد ميوجلوبين بالبروتينات الأخرى (Bemofsky et al 1959, Ledward 1971).

(٣) تحويل فىرى هيم (Ferriheme) إلى بروتينات لحوم أخرى وخاصة الألبومين (Ledward, 1971).

● حساسية طريقة الأجار جيل الترسيب تستعمل لتعيين أنواع التغيرات الطبيعية بالأمصال المضادة لعزل أنواع الميوجلوبين (Warne CKE & Saffle 1968a; b, Fugate 1971) ولقد وجد هؤلاء العلماء حدود واضحة لخطوط الترسيب فى الانتشار فى الجيل عند مستوى ٣٪ بين مستخلصات تلوث اللحوم المفرومة البقرية بلحوم الخيل والأمصال المضادة لمستخلص لحوم الخيل .

والعالم فيوجت (Gygate) استخدم أسلوب أو نمط الحفر المتعددة على جانبي ثلاث أحواض من الأجار فى البتردش (Petridish) (وهو صحن زجاجي صغير رقيق ذو غطاء مرن يستعمل بخاصة فى المختبرات لزج البكتيريا) لتعيين التفاعلات التداخلية لمركبات مجهولة مع عديد من الأمصال المضادة. ولقد عين العالم فيوجت بدقة ١١ عينة من ١٢ عينة من اللحوم البقرية الطازجة المفرومة الملوثة أو المغشوشة بالحد الأدنى ١٠٪ من لحوم الخنزير، ٥٪ من لحوم الأغنام أو الخيل، قوة الخطوط المترسبة تدل على انخفاض مستويات التلوث التى يجب تعيينها.

نظام الأجار جيل المشروح فى شكل ١١ لتعيين لحوم الخيل فى سجن

للحوم البقرية بمضاد أمصال ميوجلوين الخيل التى لا تشاهد فى التفاعلات التداخلية بين لحوم البقر والخيل (كما شرحها أيضاً Hashimoto and Yasui 1954).

● نظم الميوجلوين ومضاد الميوجلوين يستعمل كعمل روتينى للتعرف على الأنواع المغشوشة من اللحوم البقرية الطازجة والمستجات المعاملة بالحرارة المتوسطة من اللحوم البقرية بالطريقة البسيطة للانتشار فى الأجارجيل. مضادات الأمصال للميوجلوين لابد أن يكون لها تأثير كبير فى التعرف على اللحوم المغشوشة (الملوثة) من أنواع اللحوم مثل الخيل، عجل البحر (seal)، الحوت (whale) أو أى أنسجة أخرى غنية بالميجلوين نسبياً. الميوجلوين يعزل من اللحوم الرخوة نسبياً والتى يوجد لها أنتيجين، عند حدوث التفاعل التداخلى، والأمصال المضادة والمحضرة لكل نوع مخصص من أنواع اللحوم بواسطة الامتصاص المناعى، والميوجلوبينات المقاومة للحرارة نسبياً.

العالم لى وآخرون ١٩٧٤ (Lee et. al 1974) لاحظوا أن حزمة الميوجلوين تختفى فى الآخر من SDS-polyacrylamide electro phoretograms للمستخلصات المائية أو المعاملة حرارياً من لحوم الأبقار. قلب العينات يسخن من صفر - ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة من ٦٥° س - ٩٠° س، بالإضافة إلى اختبارات الأجارجيل المترسب تكون:

- (١) سهولة التنفيذ.
- (٢) رخيص نسبياً.
- (٣) سهولة التصوير عند ظهور الدليل (البينة).

التقدير فى حدود ٣٪ تقريباً يمكن الحصول عليه من طريقة الانتشار بالأجارجيل عند اختبار اللحوم الطازجة أو المتجات المعاملة بحرارة متوسطة.

أما الحرارة الشديدة تقلل من حساسية هذه الطريقة للمنتجات الملوثة.

DETECTING FOREIGN FLESH IN BEEF PRODUCTS

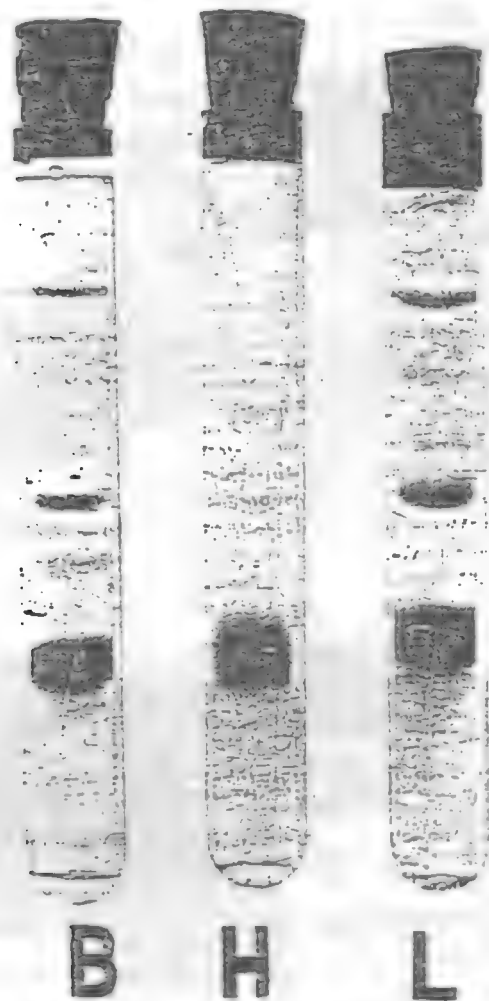


Fig. 1—SDS-acrylamide electrophoretograms of horse skeletal muscle myoglobin (H), and bovine and lamb heart myoglobin (B and L). Samples were 5 mg protein each, and electrophoresis was from top (cathode) to bottom (anode).

شكل (١)

الفصل الثالث: الكشف عن لحوم الخنزير ومحتاجات في المنتجات الغذائية

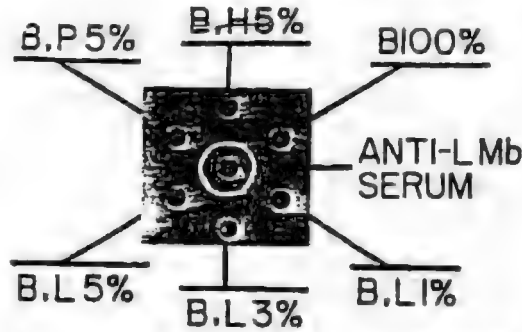


Fig. 2—Agar-gel precipitation reactions between a rabbit antiserum to lamb heart myoglobin and extracts of beef sausage (B100%); beef sausage which contained 5% pork flesh (B,P5%); 5% horse flesh (B,H5%) and 1, 3 and 5% lamb flesh (B,L1%); (B,L3%); and (B,L5%).

شكل (٢)

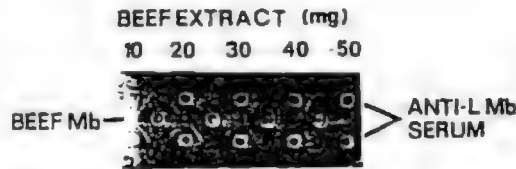


Fig. 3—Agar-gel precipitation reactions between beef heart myoglobin (1 mg/ml) and rabbit antiserum to lamb heart myoglobin absorbed with graded amounts of lyophilized aqueous extracts of beef.

شكل (٣)



Fig. 4—Agar-gel precipitation reactions between lamb heart myoglobin (1 mg/ml) and rabbit antiserum to lamb heart myoglobin absorbed with graded amounts of lyophilized aqueous extracts of beef.

شكل (٤)

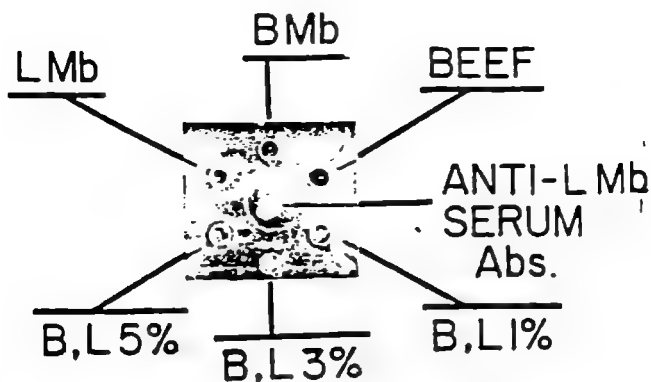


Fig. 5—Agar-gel precipitin reactions with a rabbit antiserum to lamb heart myoglobin previously absorbed with lyophilized aqueous extract of beef (50 mg/2 ml). The peripheral wells contained lamb myoglobin 1 mg/ml (LMb), beef myoglobin 1 mg/ml (BMB), extract of beef (BEEF) and extracts of beef which contained 1, 3 and 5% lamb flesh.

شكل (٥)

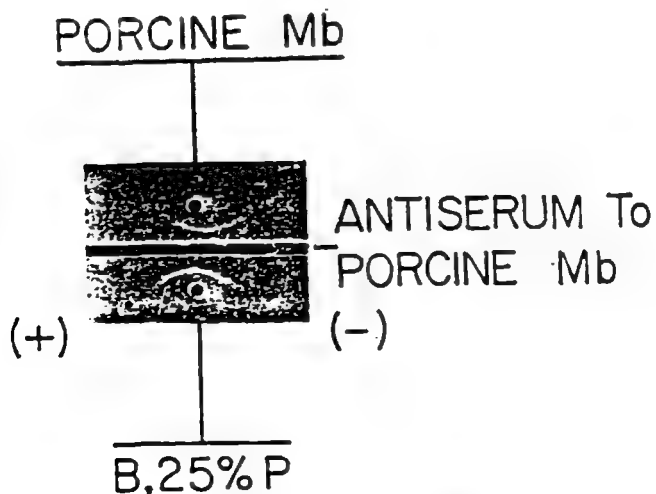
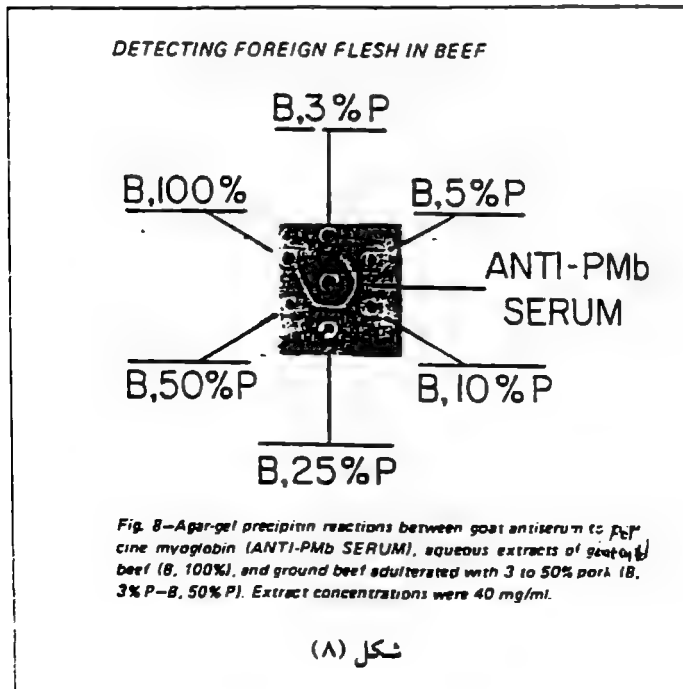
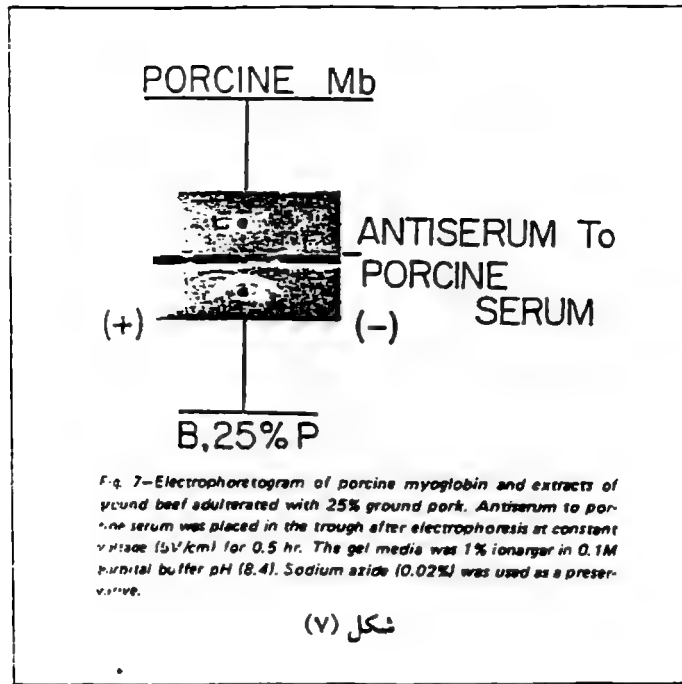
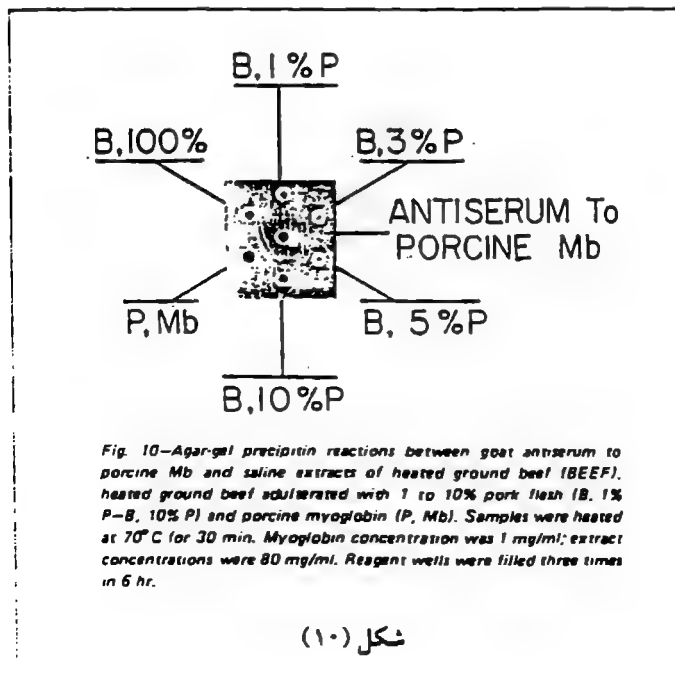
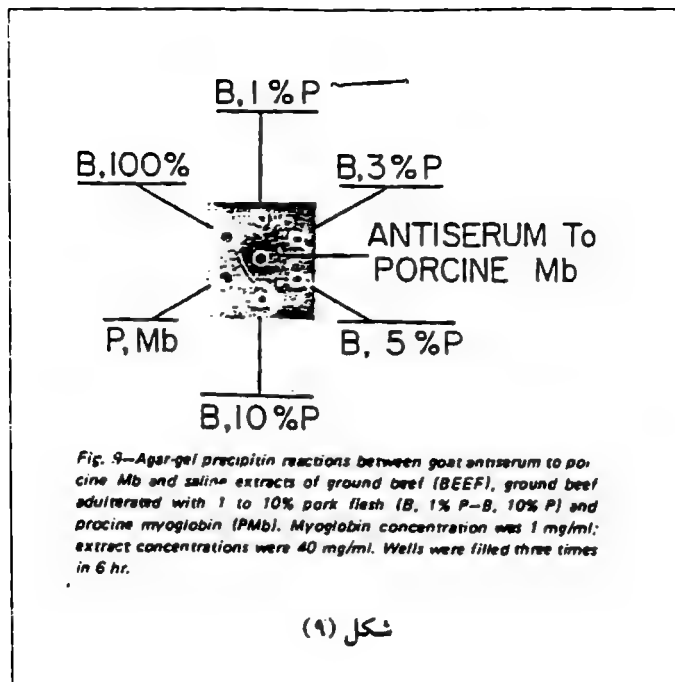
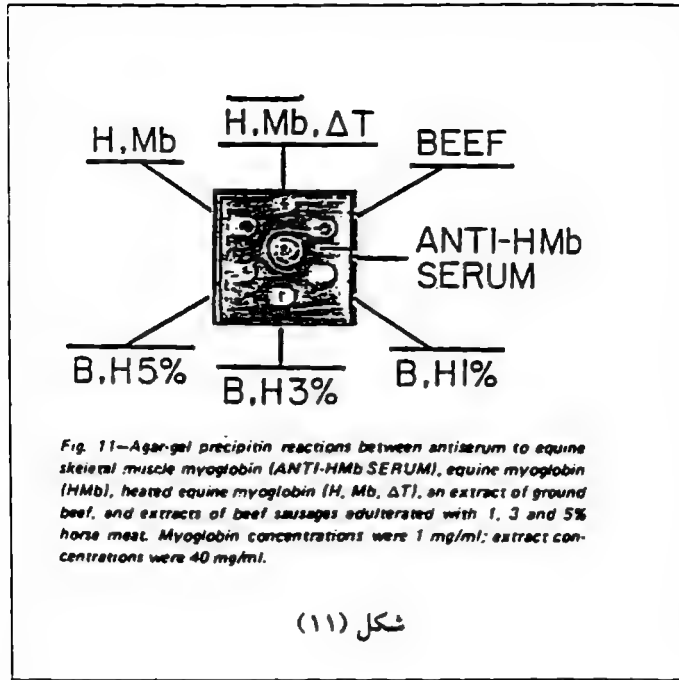


Fig. 6—Electrophoretogram of porcine myoglobin and extract of ground beef adulterated with 25% ground pork. Antiserum to porcine myoglobin was placed in the center trough after electrophoresis at Constant Voltage (5 V/cm) for 0.5 hr. The gel media was 1% ionagar in 0.1M barbita' buffer pH (8.4). Sodium azide (0.02%) was used as a preservative.

شكل (٦)







المراجع:

- Akeson, A. and Therorell, H. 1960. On the microheterogeneity of horse myoglobin. Arch. Biochem. Biophys. 91: 319.
- Atassi, M. Z. 1967. Immunochemistry of sperm-whale myoglobin prepared with various modified porphyrins and metalloporphyrins. Biochem. J. 103: 29.
- Atassi, M. Z. 1973 Antigenic structures of proteins inferred from myoglobin as the first proteins inferred from myoglobin as the first protein whose antigenic structure has reached completion. In "Specific Receptors of Antibodies, Antigens and Cells," 3rd Int. Convoc. Immunol., Buffalo, NY., 1972, p. 118.
- Atassi, M. Z., Tarlowski, D.P. and Paull, J. H. 1970. Immunochemistry of sperm whale myoglobin. 7. Correlation of immunochemical cross-reaction of eight myoglobins with structural similarity and its dependence on conformation. Biochem. Biophys. Acta 221: 623.
- Awad, E. S. and Kotite, L. 1966. Camel myoglobin. Biochem. J. 98: 909.
- Beger, H. 1924. Versuche zur beseitigung der heterologen trübungen bei präzipitierenden eiweissantiseren. Zbl. Bakt. I. Orig. 91: 519.
- Bernofsky, C., Fox, J. B. Jr. and Schewigert, B. S. 1959. Biochemistry of myoglobin. 7. The effect of cooking on myoglobin in beef muscle. Food Res. 24: 339.
- Bolin, F. M. 1931. The detection of horse meat as an adulterant in

- sausage, and other studies on the precipitin test. Am. Vet. Med. Assoc. 31: 163.
- Cornish, D. G. 1973. Characteristics of turkey hemoproteins and their reactions in meat and model systems. University Micro-films, Ann Arbor, MI 73 - 15, 350.
- Davies, C. K. Jr. 1962. The effect of heat on the water soluble proteins of beef skeletal muscle. Univ. Microfilms, Ann Arbor, MI # 62 - 3443.
- Draudt, H. N. 1969. Effect of heating on the behavior of meat pigments. Reciprocal Meats Conf. Ann Proc. 22: 180.
- Forssman, J. 1911. Die herstellung hochwertiger spezifischer schafhamolysine ohne verwendung von schafblut. Einbeitrag zur lehre von heterologer antikörperbildung. Biochem. Ztschr. 37: 78; Cited by Carpenter, P. L. 1965. "Immunology and Serology, " p. 66ff. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Fugate, G. 1971. Immunodiffusion technique for the identification of animal species. J. Immunodiffusion technique for the identification of animal species. J. AOAC 54: 1152.
- Fujiwara, K. 1922. Kochkoaguliertes serum als präzipitinogen Dtsch. Ztschr. f.d.ges. Gerictl. Med. 1: 562.
- Furth, J. 1925. Antigenci character of heated protein J. Immunol. 10: 777.
- Han, K., Dautrevaux, M., Chaila, X. and Biserte, G. 1970. The covalent structure of beef heart myooglobin. Eur. J. Biochem. 16: 465.

- Han, K., Tetaert, D., Moschetto, Y. and Dautrevaux, M. 1972. The covalent structure of sheep-heart myoglobin. *Eur. J. Biochem.* 27: 585.
- Hashimoto, Y. and Yasui, T. 1957. Researches on the detection of meat by serological test. *J. Faculty Agric. Hokkaido* 50 (3): 171.
- Hayden, A. R. 1977. Detection of chicken flesh in beef sausages. *J. Food Sci.* 42: 1189.
- Hayden, A.R. 1978. Determination of residual species serum albumin in adulterated ground beef. *J. Food Sci.* 43: 476.
- Helm, M. B., Warnecke, M. O. and Saffle, R. L. 1971. Gamma globulin isolated from rabbit serum for rapid detection of meat adulteration. *J. Food Sci.* 36: 998.
- Henney, C. S. and Ishizaka, K. 1968. Antigenic determinants specific for aggregated γ -G-globulins. *J. Immunol.* 100: 718.
- Kagen, L. J. and Gurevich, R. 1967. Immune precipitin reactions between anti-human myoglobin antiserum and several purified primate myoglobins. *Immunology* 13: 201.
- Kagen, L. J. and Linder, S. 1968. Immunological studies on duck myoglobin. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* 128: 438.
- Karpas, A. B., Myers, W. L. and Seagre, D. 1970. Serological identification of species of origin of sausage meats. *J. Food Sci.* 35: 150.
- Lawrie, R. A. 1950. Some observations on factors affecting myoglobin concentrations in muscles. *J. Agric. Sci.* 40: 356.
- Lawrie, R. A. 1953. The activity of the cytochrome system in muscle and its relation to myoglobin. *Biochemistry* 55: 305.

- Ledward, D. A. 1971. On the nature of cooked meat hemoproteins. J. Food Sci. 36: 883.
- Lee, Y. B., Rickansrud, D. A., Hagberg, E.C. and Briskey, E. J. 1974. Application of SDS-acry lamide gel electrophoresis for determination of the maximum temperature to which bovine muscles have been cooked. J. Food Sci. 39: 428.
- Lehninger, A. L. 1975. "Biochemistry", 2nd ed, p. 59. Worth Publishers, Inc., New York.

**طريقة التعرف السريع على لحوم الخنزير
فى منتجات اللحوم بالانتشار المناعى فى الآجار جيل
(طريقة معدلة)**

**Mark E. Cutrufelli, Richard P. Mageau Bernard
Schwab, and Ralph W. Johnston; Developoment of porcine
rapid identification Method (PRIME) by Modified Agar -
Gel. Immunodiffusion. J. Assoc. off. Anal. chem. (vol.
71. No2, 1988)**

طريقة التعرف السريع على لحوم الخنزير فى منتجات اللحوم بالانتشار المناعى فى الآجار جيل (طريقة معدلة)

أساس الطريقة:

تستخدم طريقة الانتشار المناعى فى الآجار جل للتعرف على لحوم الخنزير فى اللحوم واللحوم المفرومة ومنتجات اللحوم الطازجة.

هذه الطريقة يستخدم فيها رقائق الآجار جل مع استخراج صورة فوتوغرافية مطبوعة لضبط وتعيين المكان الملائم لاستقرار الكاشف المجفف بالتجميد على الأقراص الورقية وأقراص العينة المشبعة فى سائل اللحوم فى خلال ١٨ - ٢٤ ساعة فى درجة حرارة الغرفة، اندماج العينة بخط الترسيب المناعى بالحزام المرجعى المنشأ فى الآجار بين الانتجن المرجعى (مادة ينشأ عن حقنها فى الجسم أجسام مضادة) والأجسام المضادة الموجودة على الأقراص تدل على وجود لحوم الخنزير فى العينة.

الكواشف المعدلة:

تحضر أقراص الأجسام المضادة للحوم الخنزير وذلك بنقع الأقراص الورقية الخام فى ٤٠ ميكرو لتر من مضادات لحوم الخنزير الموجودة فى البيومين الماعز.

يحضر الانتجن المرجعى للحوم الخنزير على أقراص ورقية خام بنقعها فى ٤٠ ميكرو لتر من مصل البيومين فى (V) للخنزير فى محلول ملهى محايد تركيز ٠,٢ % للفوسفات وأس هيدروجينى (PH) ٧,٢ تترك الأقراص لتمدص كواشفها طوال الليل فى التجميد المجفف. تحضر رقائق الانتشار المناعى التى

يستعاض عنها بصيغة الفلورسين عند تركيز نهائى ١ : ٦٠٠٠٠ فى الآجار لتمييز التعرف السريع على لحوم التخزين فى منتجات اللحوم.

مميزات التفاعل:

التعيين الدقيق لاختبار التعرف السريع على لحوم التخزين فى منتجات اللحوم يحدد بتفاعل الأقراص الورقية الخام المشبعة فى سائل لحوم التخزين المتماثلة وسوائل اللحوم المختلفة (المتنافرة) المضادة للأجسام المضادة المرجعية الموجودة على الأقراص. الحساسية المطبقة على خليط اللحوم المفرومة يحدد مقدارها باختبار محضر بعينه مؤلفة (مركبة) من كميات معروفة من لحوم التخزين المغشوش بها اللحوم الحمراء المفرومة. تكرر التجربة ثلاث مرات على مستوى غش (١-٢٢ %) بالوزن. وجود شريط من الترسيب المناعى المرئى مندمج مع الشرط المرجعى يحمل دليل اكتشاف نسبة مستوى الغش.

ثبات محتويات الكواشف:

تقيم قوة أقراص الكواشف بقوة بعض تحضيرات الأجسام المضادة للانتجن المرجعى للحوم التخزين الموجودة فى قوارير زجاجية ذات غطاء محكم فى درجة حرارة الغرفة والمبردة (٤° س) دورياً على فترات منتظمة ويجب أن لا تفقد قوة الترسيب المناعى.

النتائج والمناقشة:

للتحديد الدقيق للتعرف السريع على لحوم التخزين فى منتجات اللحوم بالانتشار المناعى فى الآجار جل يستخدم مضادات لحوم التخزين الموجودة فى مصل الماعز.

جدول (١)

النتائج العملية والمخفية للتعرف السريع على لحوم الخنزير في منتجات اللحوم المختلفة

المنتجات	نوع وتركيب المنتج	عدد العينات	عدد العينات المخلوطة بلحوم الخنزير	العينات الإيجابية
المحاولات العملية				
متحلب فرائك	ماشية، خنزير، (دجاج)	٢	٢	٢
متحلب فرائك	ماشية، خنزير، دجاج	٢	٢	٢
متحلب فرائك	ماشية، (خنزير)	٦	صفر	صفر
متحلب فرائك	ماشية، خنزير	٢	٢	٢
متحلب فرائك	دجاج	٢	٢	٢
متحلب بولونجا	ماشية	٤	صفر	صفر
متحلب بولونجا	ماشية، خنزير	٢	صفر	صفر
سحق خنزير	خنزير	٢	٢	٢
سحق خنزير	خنزير، (ماشية)	٦	٦	٦
لحم مفروم	ماشية، خنزير، (دجاج)	٤	٤	٤
سحق الماني	ماشية، (خنزير)	٢	٢	٢
خليط بقرى بانيه	ماشية، (خنزير)	٢	٢	٢
لحم خنزير مفروم	خنزير، (ماشية)	٢	٢	٢
لحم خنزير مفروم	خنزير	٦	٦	٦
لحم بقرى مفروم	ماشية (دجاج)	٣	٣	٣
لحم بقرى مفروم	ماشية (خنزير، دجاج)	٢	صفر	صفر
لحم بقرى مفروم	ماشية	٢	٢	٢
لحوم الماشية	ماشية	٢	صفر	صفر
لحوم خنزير	خنزير	١	صفر	صفر
		٩	٩	٩
المجموع		٦٣	٤٦	٤٦
المحاولات المخفية				
سحق خنزير	خنزير	٤	٤	٤
سحق إيطالي	خنزير	٨	٨	٨
لحم خنزير مفروم	خنزير	٤	٤	٤
لحم ماشية مفروم	ماشية	٢	صفر	صفر
لحم بقرى	ماشية	٢	صفر	صفر
المجموع		٢٠	١٦	١٦

تفاعل الاختبار الموجود لعينات اللحوم واللحوم المفرومة المعروف نوعها: الخنزير (+)، الخيل (-)، الماشية (-)، الغنم (-)، الغزال (-)، الدجاج (-)، الرومى (-) الكنجارو الأحمر (-). هذه النتائج دلت على أن اختبار السريع على لحوم الخنزير فى منتجات اللحوم يقابل مشاكل مضادة للتفاعل (cross-reactivity) يجب ألا ترتفع إذا كان التفاعل مناسب للأجسام المضادة للخنزير فى المصل والمستخدم كأجسام مضادة على الأقراس المعدة لذلك.

حساسية هذه الدراسة تبين الفش بلحوم الخنزير من ٣-٥٪ فى لحوم الماشية والأغنام ويظهر شريط الترسيب المناعى عند نهاية النقط ضعيف. هذه المستويات من الحساسية تؤخذ بعين الاعتبار بملائمتها العالية للاستخدام المطلوب بهذه الطريقة.

ثبات محتوى الكواشف يستمر لمدة عام عند درجة حرارة ٤° س، ٦ شهور عند درجة حرارة الغرفة ويجد حفظ الكواشف فى درجة حرارة المبرد للحصول على أطول مدة ثبات.

تحليل نتائج محاولات العينات المعملية والحقلية الموجود فى الجدول السابق ذكره مجموع العينات المحللة ٨٣ منها ٦٢ عينات إيجابية محتوية على بروتينات خنزير، ٢٠ عينة سالبة لا يوجد بها بروتينات خنزير وبقى العينات غاب عنها الإيجابية أو السلبية وتعد هذه الطريقة مطلوبة فى الكشف عن لحوم الخنزير فى اللحوم ومتجاتها، ويوصى عمل تجارب تأكيدية للنتائج الموجبة بواسطة ouchterlony immunodiffusion technique أو باستخدام iso electric focusing.

هذه الطريقة تستخدم عالمياً وخاصة فى الولايات المتحدة الأمريكية وفى المعامل التجارية.

المراجع:

- * Mageau, R. PP., Cutrufelli, M. E., Schwab, B., & Johnston, R. W. (1984) J. Assoc. off. Anal. chem. 67, 949-954.
- * Cutrufelli, M. E., Mageau, R. P., Schwab, B., && Johnston, R. W. (1986) J. Assoc. off. Anal. chem. 69, 483-487.
- * Cutrufelli, M. E., Maggau, R. P., Schwab, B. & Johnston, R. W. (1987) J. Assoc. off. Anal. chem. 70, 230-233.
- * "Changes in Methods", (1987) J. Assoc. off. Anal. chem, 70, 389-390, sec. 24, c01- 24. c06.
- * Fugate, H. G., & penn, S. R. (1971) J. Assoc. off. Anal. chem. 54, 1152-1156.
- * Hamitton, W. D. (1982) J. Assoc. off. Anal. chem. 65, 119-122.

**الكشف عن لحوم الدواجن والخنزير المطهية واللحوم المعلبة
بطريقة الامتصاص المناعي بالارتباط الانزيمي**

**Ronald G. Berger, Richard P. Mageau, Bernard Schwb,
and Ralph W. Johnston. Detection of poultry and pork in
cooked and canned meat Foods by Enzyme - Linked
immunosorbent Assays. J. Assoc. off. Anal. Chem. vol.
71, No. 2, 1988.**

الكشف عن لحوم الدواجن والخنزير المطهية واللحوم المعلبة بطريقة الامتصاص المناعي بالارتباط الانزيمي

اساس الطريقة:

تعتمد هذه الطريقة على الاختبار المناعي بالارتباط الانزيمي ELISA بنوع معين من اللحم (الدجاج، الخنزير) على الأجسام المضادة Antibodies لهذا اللحم إلى مستخلص الأنواع المختلفة من لحوم الدواجن والخنزير المطهية واللحوم المعلبة حيث يحدث ارتباط بين جزيئات الكشف الخاص بنوع معين من اللحم ولا يحدث ارتباط مع باقى الأنواع الأخرى:

الطريقة:

★ تحضير الانتجين Immunizing Antigen

- ١- يوزن كيلو جرام لحم طازج من كل من الخنزير والدجاج ثم يقسم كل كيلو جرام إلى أربعة أجزاء متساوية (٢٥٠ جم).
- ٢- يضاف لكل ٢٥٠ جم من اللحم ٥٠٠ ملل من كلوريد صوديوم ١٤,٠ مم (0.14M NaCl) وتجنس مدة ٣ دقائق فى الخلط.
- ٣- يترك المخلوط لمدة ساعة فى درجة حرارة الحجرة.
- ٤- يدور المخلوط فى جهاز الطرد المركزى عند ١٠,٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ٢٠ دقيقة عند درجة حرارة ٤° س.
- ٥- يرشح السائل الطافى من خلال ورق الترشيح رقم ٤٢.
- ٦- يخفف الراشح بماء مقطر حتى ٩٥٠ ملل.

- ٧- يضاف ٥٠ ملل خلات الصوديوم ١ ، ٠ إم (1.0M Sodium acetate) ويتبع بإضافة ٣٦١ جرام من كبريتات الأمونيوم (ammonium sulfate).
- ٨- بعد إذابة كبريتات الأمونيوم يترك المستخلص طول الليل عند درجة حرارة 4°C .
- ٩- يدور المستخلص فى جهاز الطرد المركزى.
- ١٠- يؤخذ السائل الطافى ويضبط الأس الهيدروجينى له عند ٩, ٤ بإضافة حامض الهيدروكلوريك واحد إن (1N HCl).
- ١١- يترك السائل فى جهاز الطرد المركزى.
- ١٣- يؤخذ السائل الطافى ويضبط الأس الهيدروجينى عند ٧, ٣ ويترك طول الليل عند درجة حرارة 4°C .
- ١٤- يكرر تدوير السائل فى جهاز الطرد المركزى.
- ١٥- يؤخذ السائل الطافى ويضاف إليه ٣٥٧ جرام كبريتات الأمونيوم المحببة مع التقليب بهدوء.
- ١٦- بعد إذابة كبريتات الأمونيوم يترك المستخلص طول الليل عند درجة حرارة 4°C .
- ١٧- يدور المستخلص فى جهاز الطرد المركزى عند ٢٧٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ١٠ دقائق عند درجة حرارة 4°C .
- ١٨- يرمى السائل ويوضع على الراسب ٦٠ ملل ماء مقطر ويكرر تدوير المستخلص فى جهاز الطرد المركزى لإزالة أى مادة غير ذائبة.
- ١٩- يديلىز (dialyze) المستخلص طول الليل ضد الماء المقطر ويركز حتى ١٠ ملل بمادة ضد الديلىزة (dialysis against) ٣٠٪ محلول مائى من ٢٠ M

بولى ايثلين جليكول (20M poly ethylene glycol) الدليلز المركز يستنزف بمحلول متعادل من ٥٠ /M خللات الصوديوم عند أسس هيدروجينى ٣,٧ (تخضير المحلول المتعادل بإضافة حامض الخليك إلى 0.01M خللات الصوديوم حتى يصل الأس الهيدروجينى إلى ٣,٧).

٢٠- تزال المادة غير الذائبة بتدويرها فى جهاز الطرد المركزى.

٢١- تكرر الخطوات السابقة حتى الحصول على ٣ أجزاء متساوية من اللحم المفروم.

٢٢- يحضر كاربوكسى مثيل سليولوز ويعادل بمحلول متعادل (0.01M خللات الصوديوم، أس هيدروجينى ٣,٧)

٢٣- يزود العمود (١,٦ × ٣٥ سم) بمحلول كاربوكسى مثيل سليولوز المتعادل ويمكن تمرير المحلول المتعادل الأولى فى العمود إذا لزم الأمر.

٢٤- يوضع المنتج (polled harvest) فى العمود ويصب عليه بالتدرج ١٨٠ ملل من المحلول المحايد الأول starting buffer، ١٦٧ ملل من المحلول المحايد المحدد limit buffer (١,٠ إم خللات الصوديوم) ٢٠ ملل/ ساعة.

٢٥- يجمع ٣ ملل من الأجزاء المستخلصة ويقاس الامتصاص عند طول موجة ٢٨٠ نانومتر فى جهاز قراءة الامتصاص المناعى.

٢٦- يركز المنتج (harvest) بواسطة مضادات الديلزة (dialysis against) ٣٠٪ ٢٠ إم بولى إيثيلين جليكول إلى ٢ ملجم بروتين/ ملل (يقدر بطريقة Lowry assay) مستخدما المصل البروتينى البقرى كمقياس (as standard) ويجب أن تكون كمية الانتيجين ٢٥ ملجم.

★ الاجسام المضادة Antibody

- ١- يخفف المصل المضاد بحجم مساوى من محلول ملهى محايد 0.01M فوسفات ذات أس هيدروجينى ٣,٢ عند درجة حرارة ٤° س.
- ٢- يضاف محلول كبريتات الأمونيوم المركز dropwise مع التقليب ويترك المحلول عند درجة حرارة ٤° س.
- ٣- يدور فى جهاز الطرد المركزى عند ١٠,٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة ١٠ دقائق عند درجة حرارة ٤° س.
- ٤- يرمى السائل الطافى ويذاب الراسب فى محلول ملهى محايد من 0.01M فوسفات.
- ٥- يعاد ترسيب جاما جلوبيولين أكثر من مرتين فى محلول كبريتات الأمونيوم المركز.
- ٦- يذاب الراسب الأخير من محلول ملهى محايد من ١,٠ إم فوسفات ثم يُدِيلز ضد المحلول الملهى المحايد من ١,٠ إم فوسفات.
- ٧- يؤخذ ٤ ملل من جاما جلوبيولين ويوضع عليها ٣٠ ملل/ ساعة محلول ملهى محايد من 0.01M فوسفات.
- ٨- يجمع ٤ ملل من محلول الخطوة السابقة (٧) ويقاس الامتصاص عند طول موجة ٢٨٠ نانومتر (المحلول يحتوى على IgG).
- ٩- يركز IgG إلى ٣ ملجم/ ملل ثم يدِيلز ضد محلول 0.1M كربونات الصوديوم ويحفظ عند درجة حرارة -٢٠س أو أقل. وتستخدم IgG إما محاطة بالأجسام المضادة المغطاة أو بيوتينيلات الأجسام المضادة.

★ بيوتينيلاتيد الاجسام المضادة

- ١- يخفف ١ ملجم من IgG في ١ ملل محلول كربونات الصوديوم ٠,١ إم.
- ٢- يذاب البيوتين - ن - هيدروكسي سكسينيميد إيستر في داي مثيل سلفوكسيد (١ ملجم/ ملل).
- ٣- يضاف ١٠٠ ميكرو لتر محلول بيوتين استر إلى IgG مع التقليب ويترك في درجة حرارة الغرفة لمدة ٤ ساعات ثم يديلز طول الليل ضد محلول الملحي للفوسفات ٠,١ إم المحتوى على ٠,٠٤٪ صوديوم أزيد عند درجة حرارة ٤° س.
- ٤- يضاف جلسرين إلى محلول بيوتينيلاتيد IgG إلى ٥٠٪ ثم يحفظ عند درجة حرارة ٢٠° س.

الضوابط:

- ١- يوزن ٢٠ جرام من اللحم المفروم وتوضع في المعدة والمعدية (Stomach) لمدة ١٠ ثوان ثم يترك لمدة ساعة عند درجة حرارة الحجرة.
- ٢- يوضع الخليط في حمام مائي مغلي لمدة ١٥ دقيقة ثم تدور في جهاز الطرد المركزي عند ١٠,٠٠٠ لفة في الدقيقة لمدة ١٥ دقيقة عند درجة حرارة ٤° س.
- ٣- تحضر مستخلصات لحوم الخيل والبقر والخنزير والغنم والغزلان والكانجارو والدجاج الرومي.
- ٤- تجهز المستخلصات غير المعامل حراريا ثم تعامل حراريا عند درجة حرارة ١٢٠° س ويستعاض عن الحرارة بالتعقيم لمدة ١٥ دقيقة.

العينات:

- ١- يضاف ١٠ مم ماء مقطر على ٥ جرام لحم مفرومة أو من لحوم معلبة فى كيس ويوضع فى المعدة والمعدة لمدة دقيقة .
- ٢- يخرج الكيس من المعدة والمعدة ويترك فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة .
- ٣- يدور المحلول فى جهاز الطرد المركزى عند ٥٦٠٠ لفة فى الدقيقة ثم يختبر السائل الطافى باليسا .

★ الامتصاص المناعى والارتباط الانزيمى ELISA

- ١- تعيين أقصى تخفيضات للأجسام المغطاة وبيوتينيلاتيد الأجسام المضادة المرتبطة بالمعايرة مستخلصات الضابط مستخدماً زيادة الارتباط بالاستربتوفيدىن بيروكسيدز بالكثافة البصرية عند طول موجة ٤١٤ نانومتر ناقص (-) الكثافة البصرية عند طول موجة ٤٩٢ نانومتر وأقل امتصاص هو ٠,٦٠٠ > للضابط المناظر، ٠,٠٦٠ < للضابط المتناظر .
- ٢- أقصى امتصاص لمحلول الكاشف ايه بى تى اس عند طول موجة ٤١٤ نانومتر وأقل امتصاص عند طول موجة ٤٩٢ نانومتر .
- ٣- يوجد فى كل قاع مسطح ٩٦ حفر، شرائح ميكرواليسا .
- ٤- يضاف ١٠٠ ميكولتر من IgG المخفف إلى ٠,٠٥ إم ترس - حامض الهيدروكلوريك (ذات اس هيدروجينى ٨,٤) والمحتوى على ٠,٠٠١ % ميرثيولات .
- ٥- تقفل كل الشرائح وتوضع فى حجرة ذات رطوبة عالية عند درجة حرارة ٤° س لمدة ٢٤ ساعة ولا تتعدى أكثر من ٦ شهور إذا لم تفتح الشرائح .
- ٦- تغسل جميع شرائح الحفر ثلاث مرات بمحلول الغسيل المحايد ٠,٠٥ إم

فوسفات (ذات الأس الهيدروجيني ٧,٢) والمحتوى على ٠,٠٥ ٪ توين ٨٠ (PBST).

٧- يضاف ١٠٠ ميكرو لتر من المحلول الملحي العادي داخل حفر الضابط.

٨- يضاف ١٠٠ ميكرو لتر من مستخلص العينات والضابط كل عينة لها ٤ حفر.

٩- تغطي الشرائح وتترك في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة.

١٠- تغسل الشرائح بواسطة بي ب اس تى (PBST) ثلاث مرات (محلول ملحي من الفوسفات يحتوى على ٠,٠٥ ٪ توين ٨٠).

١١- يوضع ٢٥ ميكرو لتر من محلول استربتافيدين بيروكسيد المرتبط في كل حفرة وتخفف بمحلول بي ب اس تى ١ : ٢٠٠٠ والمحتوى على ١٠ ٪ من مصل الأرانب العادي الساخن غير النشط.

١٢- تغطي الشرائح وتترك في درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة ثم تغسل ٤ مرات بالمحلول المحايد بي ب اس تى وتترك آخر غسلة في الحفر وتغطي وتترك في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة.

١٣- يشطف المحلول المحايد بي ب اس تى ويضاف ٥٠ ميكرو لتر من محلول المادة الخاضعة (substrate) وتركب من 0.4m M2,2 - azino - di - C 3 ethylbenzthiazoline - 6- sulfonate) and 1.3mM H₂O₂ in 0.1M NO₂ HPO₄ - citrie acid buffer ذات أس هيدروجيني ٤ لكل حفرة.

١٤- تغطي الشرائح وتحضن لمدة ٣٠ دقيقة ثم يضاف ٥٠ ميكرو لتر من محلول الإيقاف ٥,٠ إم حمض ستريك في كل الحفر.

١٥- تقرأ الشرائح وتعين لها الكثافة البصرية (optical density) في جهاز قراءة

الامتصاص المناعى عند طول موجة ٤١٤ نانومتر سالب (-) (Minus)
الكثافة البصرية (OD) عند طول موجة ٤٩٢ نانومتر.

تحليل المعطيات:

١- الأجسام المضادة المتدفقة والمستخدمة فى طريقة اليسا للدواجن معايرة حتى ١ : ٥٠٠ للأجسام المضادة المغطاة، ١ : ٧٠ للأجسام المضادة لليوتينيلاتيد. أما الأجسام المضادة للخنزير فى طريقة اليسا معايرة حتى ١ : ٢٠٠٠ للأجسام المضادة المغطاة، ١ : ٩٠ للأجسام المضادة لليوتينيلاتيد.

٢- يتبين من جدول ١، ٢ خصوصية لحوم الخنزير والدجاج فى نظام اليسا كما يبين تأثير الحرارة على مستخلص الضابط (Control).

• ويتبين من الجدول رقم (١) أنه لا يوجد تداخل تفاعلى مع مستخلص اللحوم الحمراء فى الدواجن بينما يوجد تفاعل قوى مع مستخلص الفرايج (Chicken) والرومى.

• كما يتبين أيضاً أنه لا يوجد تداخل تفاعلى مع مستخلص لحوم الخنزير المعاملة حرارية ومستخلصات الضوابط المتنافرة. بينما مستخلصات الضوابط للحوم الخنزير تتفاعل بقوة تحت أى ظروف كما هو مبين فى جدول (٢).

• يوجد تفاعل بسيط مع مستخلصات لحوم الضوابط غير المعاملة حرارياً من الخيل والبقر والغنم والغزلان مع الامتصاص المناعى بالارتباط الانزيمى للحوم الخنزير.

• تفاعل المستخلص يقل تفاعله قليلاً بالحرارة التى تزيد عن ١٠٠°س لمدة ١٥ دقيقة إلى ١٢٠°س لمدة ١٥ دقيقة للامتصاص المناعى بالارتباط الانزيمى (اليسا) للدجاج وأيضاً كذلك الخنزير.

جدول (٣) يوجد به نتيجة الامتصاص المناعي بالارتباط الانزيمى (اليسا) لمستخلصات العينة المعاملة حراريا (المطبوخة) والمعلبة.

• هذه الطريقة حساسيتها للحوم الدواجن ١٢٦ جزء فى المليون وللحوم الخنزير ٢٥٠ جزء فى المليون.

• جميع مستخلصات عينات الضابط المختلفة المعاملة حراريا (١٠٠° س لمدة ١٥ دقيقة) وجميع مستخلصات العينات التى درست وجد أن متوسط الكثافة البصرية (OD) هى ٠,٠٢٥ ومعامل إنحراف ٠,٠٠٩ (حجم العينة ٤٠٠ حفرة) لعينات الدجاج ومتوسط ٠,٠٦١ \pm ٠,٠٢١ (٥٠٠ حفرة) للخنزير.

أى عينة لها كثافة بصرية عالية مدروسة تحتوى لحوم دجاج أو لحوم خنزير، توضع هذه القيم على الأحداث الرأسى فى الرسم ١، ٢ والمتوافق مع لوج ١٠ ويمكن قراءة الكثافة البصرية (OD) على الأحداث السينى.

• هذه الطريقة تكشف عن لحم الدجاج برقم معنوى هو ٠,٠٥٢ عند لوح تخفيف ٣,٩ أو ١ : ٧٩٤٣ وهذا يمثل ١٢٦ جزء فى المليون وللخنزير ٢٥٠ جزء فى المليون.

جدول (١)

مستخلص لحوم الدجاج الضابط فى اليسا^(*) (mean \pm SD) (٢٠ حفرة)

نوع الحيوان	غير معاملة حراريا	١٠٠°س لمدة ١٥ دقيقة	١٢٠°س لمدة ١٥ دقيقة
الحصان	٠,٠١٥ \pm ٠,٠٦٨	٠,٠٠٦ \pm ٠,٠٢٤	٠,٠٠٧ \pm ٠,٠٢٧
البقر	٠,٠٢١ \pm ٠,٠٨٦	٠,٠٠٤ \pm ٠,٠٢٤	٠,٠٠٧ \pm ٠,٠٢٤
الخنزير	٠,٠٠٨ \pm ٠,٠٣٥	٠,٠٠٤ \pm ٠,٠٢٠	٠,٠٠٣ \pm ٠,٠١٩
الغنم	٠,٠٢٠ \pm ٠,٠٦٨	٠,٠٠٤ \pm ٠,٠٢٢	٠,٠٠٣ \pm ٠,٠٢٢
الغزال	٠,٠١٤ \pm ٠,٠٤٨	٠,٠٠٨ \pm ٠,٠٢٢	٠,٠٠٤ \pm ٠,٠١٩
الكالمجارو	٠,٠٠٥ \pm ٠,٠٣٦	٠,٠١٠ \pm ٠,٠٤١	٠,٠٠٩ \pm ٠,٠٤٢
الدجاج	٠,٠٣٠ \pm ٠,٠٧٧٥	٠,٠٣٨ \pm ٠,٠٧٤٢ (ب)	٠,٠٣١ \pm ٠,٠٧٤٢
الرومى	٠,٠٢٥ \pm ٠,٠٦٧٦	٠,٠٢٣ \pm ٠,٠٥٥٢	٠,٠٥٥ \pm ٠,٠٥٥

(*) الكثافة البصرية ٤١٤ - ٤٩٢ نانومتر - (ب) ٤٠ حفرة اختبار.

جدول (٢)

مستخلصات لحوم الخنزير الضابط فى اليسا^(*) (mean \pm SD) (٢٠ حفرة)

نوع الحيوان	غير معاملة حراريا	١٠٠°س لمدة ١٥ دقيقة	١٢٠°س لمدة ١٥ دقيقة
الحصان	٠,٠١٧ \pm ٠,١٦٧	٠,٠٠٤ \pm ٠,٠٦٤	٠,٠١٦ \pm ٠,٠٨٨
البقر	٠,٠٥٩ \pm ٠,١٣١	٠,٠٠٩ \pm ٠,٠٥٣	٠,٠١٢ \pm ٠,٠٤٨
الخنزير	٠,٠٣٣ \pm ٠,٠٧٩٥	٠,٠٦٠ \pm ٠,٠٧١٩ (ب)	٠,٠٦٨ \pm ٠,٠٦٨٣
الغنم	٠,٠١٨ \pm ٠,٠٢٤٣	٠,٠٠٦ \pm ٠,٠٦٢	٠,٠٠٩ \pm ٠,٠٥٩
الغزال	٠,٠٧٧ \pm ٠,١٣٠	٠,٠٠٧٧ \pm ٠,٠٥٨	٠,٠٠٩ \pm ٠,٠٥٦
الكالمجارو	٠,٠٠٧ \pm ٠,٠٥٤	٠,٠٠٦ \pm ٠,٠٤٥	٠,٠٠٦ \pm ٠,٠٤٧
الدجاج	٠,٠١٠ \pm ٠,٠٥٦	٠,٠٠٨ \pm ٠,٠٤٤	٠,٠٠٨ \pm ٠,٠٤٢
الرومى	٠,٠٠٤ \pm ٠,٠٥٩	٠,٠٠٧ \pm ٠,٠٤٨	٠,٠١٠ \pm ٠,٠٥٢

(*) الكثافة البصرية ٤١٤ - ٤٩٢ نانومتر - (ب) ٣٨ حفرة اختبار.

جدول (٣)

مستخلص عينات اللحوم المطهية (المعاملة حراريا) للدجاج والخنزير
ولحوم المملبات (*) ($\text{mean} \pm \text{SD}$) ٢٠ حفر اختبار
(*) الكثافة البصرية (٤١٤ - ٤٩٢)

نوع الحيوان	دجاج البيا	خنزير البيا
● فارنكفورت		
الحصان	0.02 ± 0.29	0.11 ± 0.76
البقر	0.06 ± 0.25	0.06 ± 0.60
الخنزير	0.02 ± 0.27	0.82 ± 0.752
الغنم	0.05 ± 0.36	0.08 ± 0.111
الغزال	0.03 ± 0.40	0.10 ± 0.113
الدجاج	0.45 ± 0.840	0.07 ± 0.65
الرومي	0.30 ± 0.664	0.04 ± 0.48
● بولوجناز		
بقر	0.04 ± 0.24	0.11 ± 0.61
خنزير	0.03 ± 0.26	0.89 ± 0.754
دجاج	0.057 ± 0.813	0.11 ± 0.71
رومي	0.05 ± 0.36	0.06 ± 0.44
● لحوم مفرومة ومضغوطة شرائح		
بقر	0.03 ± 0.14	0.04 ± 0.054
خنزير	0.05 ± 0.15	0.23 ± 0.647
دجاج	0.19 ± 0.691	0.04 ± 0.46
رومي	0.33 ± 0.567	0.03 ± 0.63

نوع الحيوان	دجاج اليا	خنزير اليا
• معلبات غلانية للأطفال		
بقر	0.005 ± 0.017	0.005 ± 0.053
خنزير	0.005 ± 0.015	0.064 ± 0.463
غنم	0.015 ± 0.005	0.005 ± 0.051
دجاج	0.037 ± 0.446	0.003 ± 0.045
رومي	0.030 ± 0.093	0.004 ± 0.044
• معلبات مشجرة		
بقر	0.002 ± 0.020	0.002 ± 0.053
خنزير	0.002 ± 0.020	0.045 ± 0.650
دجاج	0.027 ± 0.445	0.006 ± 0.053

BERGER ET AL.: J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. VOL. 71, NO. 2, 1988

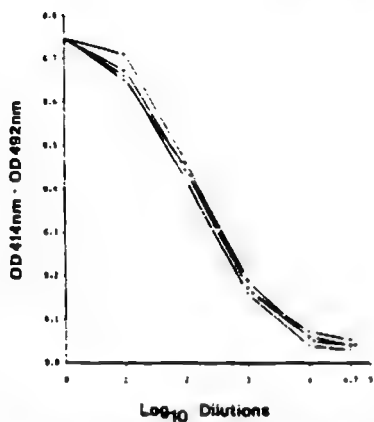


Figure 1. Effect of diluting chicken control extract (100°C for 15 min) in control extracts (100°C for 15 min) of horse (Φ), beef (*) and pork (+) and beef frankfurter sample extract (Θ).

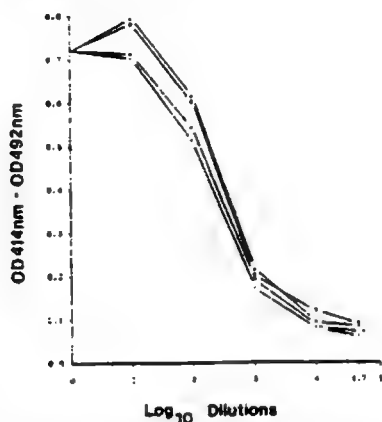


Figure 2. Effect of diluting pork control extract (100°C for 15 min) in control extracts (100°C for 15 min) of horse (Φ), beef (*) and chicken (+) and beef frankfurter sample extract (Θ).

شكل (١)

المراجع:

- (1) Fugate, H. G., & Penn, S.R. (1971) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 54, 1152-1156.
- (2) Whittaker, R. G., Spencer, T. L., & Copland, J. W. (1983) *J. Sci. Food Agric.* 34, 1134-1148.
- (3) Sinclair, A. J., & Slattery, W. J. (1982) *Aust. Vet. J.* 58, 79-80.
- (4) King, N. L. (1984) *Meat Sci.* 11, 1-14.
- (5) Milgrom, F., Tuggac, Z. M., & Witebsky, E. (1964) *J. Immunol.* 93, 902-909.
- (6) Hayden, A. R. (1981) *J. Food Sci.* 46, 1810-1813.
- (7) Kang'ethe, E. K., Lindquist, K. J., & Gathuma, J. M. (1985) in *Biochemical Identification of Meat Species*, R. L.S. Patterson (Ed.) Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, NY, pp. 129-144.
- (8) Manz, J. (1985) *Fleischwirtsch* 65, 497-499.
- (9) Lowry, O. H., Rosenbrough, J. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- (10) Weimer, H. E., Mehl, J. W., & Winzler, R. J. (1950) *J. Biol. Chem.* 185, 651-568.
- (11) Wilchek, M., & Bayer, E. A. (1984) *Immunol. Today* 5, 39-43.
- (12) Chalet, L., & Wolf, F. J. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* 106, 1-5.

التعرف على اللحوم بجهاز الكروماتوجراف السائل

Liquid Chromatographic Identification of Meats

**SAMY H. Ashoor, Woodrow C. Monte and Philip G,
Stiles**

J. Assoc. off Anal., Chem. Cvol, 71. No. 2, 1988.

التعرف على اللحوم بجهاز الكروماتوجراف السائل (LC) Liquid Chromatographic Identification of meat

أساس الطريقة:

لحوم البقر الخام، الخنزير، البتلو، الغنم، الدجاج، الرومي والبط يمكن التعرف عليها بطريقة جهاز الكروماتوجراف السائل.

عينات اللحوم المفرومة في الماء يفصل منها البروتين المذاب بواسطة جهاز الكروماتوجراف السائل، قطעים اللحوم وأجزائها من نفس النوع تشابه الصور الجانبية المختلفة للكروماتوجراف وتختلف فقط كميًا. بينما نتائج قطעים اللحوم أو الأجزاء المختلفة الأنواع الناتجة في اختلاف الصور الجانبية للكروماتوجراف.

الاختلاف الكمي أو الكيفي للكروماتوجراف لجميع أنواع اللحوم المستخدمة للتعرف عليها. طريقة جهاز الكروماتوجراف السائل تطبق فقط على اللحوم الطازجة والمجمدة.

وهذه طريقة بسيطة وسريعة ومناسبة ويمكن استخدامها للتعرف كميًا على أنواع اللحوم في اللحوم المفرومة غير المطهية.

وهذه الطريقة باستخدام جهاز الكروماتوجراف السائل تتطلب حوالي ساعة تقريبًا للحصول على التحليل الكلي.

الطريقة:

★ الاجمزة:

أ - جهاز الكروماتوجراف السائل Liquid chromatograph

ب- البيانات المعدلة Data module

ج- أعمدة الكروماتوجراف السائل LC Column

د- مفرمة Blender

و- جهاز كاشف Detector

★ الكواشف:

أ- اسيتوت ترين .

ب- ماء مقطر متأين .

ج- ترائى فلورو حمض الاستيك (TFA) .

د- الطور المستحرك للكروماتوجراف السائل (مذيب أ، ١ ، ٠ % من ترائى فلورو حمض الاستيك فى الماء، مذيب ب، اسيتونتريل مضاف إليه الماء وترائى فلورو حمض الاستيك (٩٥ + ٥ + ٠) يستخدم الخط المدرج والمبرمج من ٣٧ - ٦٠ % للاستيتونتريل فى ٥٥ دقيقة، ١٥ دقيقة. توازن عند معدل الانسياب ١,٥ ملل/ الدقيقة .

هـ- مصل الألبومين للفصيلة البقرية (BSA)

و- صوديوم أزيد .

★ العينات:

أ- اللحوم من محلات الجزارة (لحوم بقرى، خنزير، غنم، بتلو من أماكن مختلفة مثل الصدر، الضلوع، الظهر والأرجل).

ب- الدواجن (لحوم كل الدجاج والرومى، البط) من المحلات المحلية وتقطع إلى صدر وأجنحة وأنفاذ وأرجل .

★ الاستخلاص المائي للبروتينات الذائبة:

- تخلى اللحوم من العظم، الدهن، الجلد (للدجاج).
- نفرم اللحوم.
- يوزن ٢٥ - ٥٠ جرام من اللحوم المفرومة.
- تمزج أوزان اللحوم المفرومة بضعفها ماء مقطر في خلاط لمدة ٥ دقائق.
- ترشيع اللحوم المزوجة بالماء.
- يضاف محلول صوديوم أريد.
- التركيز النهائي للراشح هو ٠,١ ٪.
- يرشح المحلول النهائي للراشح من خلال ورق ترشيع ٠,٤٥ ميكروتر في قوارير رجاجية للكروماتوجراف السائل للتحليل.

★ التحليل بواسطة الكروماتوجراف السائل:

- يحقن ٥ ميكروتر من محلول BSA في LC ثلاث مرات ويعين متوسط وقت الانحباس.
- يحقن ١٠ - ٢٥ ميكروتر من ترشيع اللحوم المفرومة في نظام LC ويعين وقت الانحباس نسبياً (نسبياً إلى قمة BSA) والنسبة المئوية لمنطقة القمم الكبيرة.
- تحليل LC مختلط من المزيج. يحقن حجم مساوى من اثنين من المزيج متابعين ويعين نسبة وقت الانحباس والنسبة المئوية لمنطقة جميع القمم.
- لتعين الأنواع الأساسية للقمم في مخلوط الكروماتوجراف باستخدام معلومات متحصل عليها من الكروماتوجراف القياسي.

★ تحضير خليط من اللحوم والدواجن المجهولة:

تستخدم طريقة LC فى تعيين ٢٠ مخلوط مجهول من اللحوم المخلوطة المختلفة بلحوم الدواجن لتكون التركيب الآتية ٥، ١٠، ٥٠٪ لحوم خنزير فى اللحوم البقرية، ٣٠٪ لحم بتلو فى لحوم بقرية، ٥، ٥٠٪ لحوم خنزير فى لحوم بتلو، ١٠، ٥٠٪ لحوم خنزير فى لحوم دجاج، ٥، ١٥، ٧٥٪ لحوم دجاج فى لحوم الرومى، ١٠، ٦٠٪، لحوم بط فى لحوم دجاج، ٥، ٥٠٪ لحوم بط فى لحوم رومى. هذه المخاليط المدونة تحضر كما شرحت أعلاه ويعين كل نوع بواسطة LC.

النتائج والمناقشة:

متوسط الوقت الاحتماسى للـ BSA كان ٨,١٥ ± ٧,٠ دقيقة حينما يكون الحقن مختلط الـ BSA تتداخل مع قمم معظم عينات اللحوم. بينما إذا كان الحقن منفصل يستخدم قياس خارجى. وللتعرف على الكميات المختلفة للكروماتوجرام أسهل وأدق.

المعلومات المتحصل عليها من تحليل LC لمختلف اللحوم وأنواع الدواجن على حدة ومختلطة فى جدول ١-٦ وشكل ١-٣ النتائج تدل على القطيعيات أو الأجزاء من نفس الأنواع تملك نفس الكروماتوجرام مع القمم والتى لها نفس أوقات الاحتباس نسبياً حتى لو اختلفت المناطق. الكميات المتماثلة من القطيعيات أو الأجزاء من نفس الأنواع والتى استخدم فيها طريقة LC وطبقت على جميع عينات اللحوم من مختلف القطيعيات أو الأجزاء. البيانات تبين أن كل أنواع لها قمم خاصة قد تستخدم فى الكشف وكمية الأنواع فى منتجات اللحوم والدواجن. بينما تطبق طريقة LC فقط على اللحوم الطازجة والمجمدة كروماتوجرام اللحوم المعاملة حرارياً غير واضح فى اللحوم الطازجة والمجمدة

ولذلك لا تستخدم في التعرف عليها. واضح أن الحرارة تغير من طبيعة البروتين الذائب في الماء. التجميد لمدة ٦ شهور عند درجة حرارة - ٤٠° س لا تغير الكروماتوجرام للأنواع المدروسة. جميع قطيعات اللحوم المستخدمة في الدراسة لها قمتين. مخصوصتين مع أوقات الاحتباس نسبياً ٠,٦١, ٠,٤٥, ٠,١. هذه القمتين الموجودة البقرية المختلطة مع جميع اللحوم الأخرى (جداول ١, ٤ وأشكال ١, ٣). جميع الأنواع المختبرة، فقط لحوم البتلو والغنم لها قمة بارزة عند وقت احتباس ٠,٦١, ٠,٤٥ كما يوجد أنواع لها قمة بارزة عند وقت احتباس ٠,٤٥, ٠,١ كما في اللحوم. وجود قمتين بارزتين تميز اللحوم والتي استخدمت في التعرف الصحيح على اللحوم في مختلط اللحوم غير المعروفة والتي تمت في المختبر.

القمم البارزة للخنزير لها أوقات احتباس نسبياً من ٠,٢٦, ٠,٧٢, بينما قمة وقت الاحتباس ٠,٧٢ تحلل في جميع كروماتوجراف الخنزير (جدول ١, ٥، وأشكال ١, ٣) ولقد اختيرت للكشف عن لحوم الخنزير في مخاليط اللحوم المجهولة والمجهزة في المعمل. والبط فقط عن جميع الأنواع له وقت احتباس ٠,٧٢ بينما البط له قمة أخرى بارزة عند وقت احتباس ٠,٧٩ وهي غير موجودة في لحوم الخنزير. قطيعات الغنم لها قمم خاصة عند أوقات احتباس نسبياً ٠,٦١, ٠,١٠, ٠,٢١, ٠,٢٢٩ (جداول ٢, ٤ وأشكال ١, ٣).

استخدام القمة بوقت احتباس نسبى ٠,٢٩, ويتعرف على لحوم الأغنام في اللحوم المخلوطة والمجهولة، فقط قطعتين من لحوم البتلو والموجودين من المحلات الموجودة من الكتف والخصر. هذه القطيعات تمنح الكروماتوجرام مثل الموجود باللحوم (جداول ١, ٢, ٤ وأشكال ١, ٣) بينما لحوم البتلو لها قمة خاصة عند وقت احتباس نسبى ٠,٢٦ ولا يوجد لها قمة مع وقت احتباس

١,٤٥، خاص باللحوم البقرية. ويمكن التعرف على لحوم البتلو فى خليط اللحوم المجهولة.

تحليل لحوم الدجاج والرومى والبط بطريقة LC تمنح أنواع قمم خاصة إذا كانت تستخدم فى التعرف الواقعى الموثوق به (جداول ٣، ٦ وأشكال ٢، ٣) جميع لحوم الدواجن المجهولة والمحضرة فى المعمل يمكن التعرف عليها بالضبط وصح باستخدام قمم خاصة بأوقات احتباس نسبياً ١,٦ للـدجاج، ١,١٠ للرومى، ١,٢٦ للبط (جدول ٦ وشكل ٣).

العوامل مثل العمر والجنس للحيوان واختلاف القطعان فى داخل النوع الواحد والمناطق الجغرافية واختلاف الفصول السنوية قد تؤثر فى الأنواع للصورة الجانبية (Profite) بينما هذه الطريقة لها قدرة كبيرة فى التعرف على لحوم ولحوم الدواجن المختلفة ببساطة وسرعة.

جدول (١): تحليل قطعيات قطاعي من لحوم الأبقار والخنزير بجهاز LC

وقت الاحتباس المناسب لقمة معمل الأليومين البفري (RRT)	Zb للمساحة الكلية للحوم الأبقار				Zb للمساحة الكلية للحوم الخنزير			
	رقبة Chuk	ضلع Rib	خصر Round	قطع لحم مستوية Round	كف Shoulder	ضلع Rib	خصر Loin	فخذ Ham
٠,٦١	١٠,٨	١٢,٤	١٢,٣	١٦,٠٠	٢,٠٤	٣,١٨	٢,٨٣	٣,٥٠
١,٠٠	٢,٠٠	٢,٦٧	٢,٥٠	٢,١٠	—	—	—	—
١,١٠	٢,١٠	٤,٨٩	٢,٦٠	٢,٠٠	١٠,٨	٢٢,١٢	٢,٣٣	٢,٠٠
١,١٦	٧,٦٥	١٤,٣	١٦,٧	١٢,٠٠	٤,١٢	٢,٠٠	٤,١٧	٣,٢٥
١,٢١	١٣,٦	١٠,٧	١٠,٢٢	٨,٣٨	١٢,٨	٢٠,٣	١١,٣	٢١,٤
١,٢٦	—	—	—	—	٣٢,٨	١٩,١	٢٥,٧	١٧,٢
١,٢٩	٣,٧٨	٤,٥٦	٢,٧٠	٢,٥٠	—	—	—	—
١,٣٨	—	—	—	—	٢,٥٠	٨,٧٩	٥,٣٣	٤,٢٠
١,٤٥	١٢,٩	١٠,١	١١,٢	١٤,٩	—	—	—	—
١,٧٢	—	—	—	—	٦,٤٦	٩,٠٥	٩,٥٠	١١,١
١,٧٩	٤,٢٢	٦,٤٤	٦,١٠	٤,٦٢	—	—	—	—
١,٨٨	٢,٢٤	٢,٠٠	٢,٩٠	٢,٦٣	—	—	—	—
٢,٠٠	—	—	—	—	٢,٤٨	٣,٣٧	٢,٨٣	٣,٤٠
٢,١٠	—	—	—	—	٦,٣٥	٤,٦٣	٥,٦٧	٤,٤٢٢
٢,٢٢	٤,٩٢	٤,٤٤	٤,٨٠	٣,٢٥	٤,٣٨	٧,٦٦	٨,١٧	٨,١٧
٢,٢٧	٦,٧١	٥,٥٦	٥,٦٠	٦,٧٥	—	—	—	—
٢,٥٩	—	—	—	—	٢,٧٥	٦,٣٢	٦,١٧	—
٢,٦٥	—	—	—	—	٣٠,٥٤	٧,٥٨	٧,١٧	١١,٣
٢,٧١	٤,٧٧	٢,٩١	٤,٧٤	٢,٨٩	—	—	—	—
٢,٧٧	٦٢١	٣,٤٢	٤,٢٢١	٤,٧٢٢	٢,٣٣	٤,٨٤	٥,٣٣	٦,٣٣
٢,٨٦	٥,٧١	٨,٦٧	٩,٠٠	٨,٢٥	—	—	—	—

- * Relative to retention time of BSA Peak.
- * Average of 2 determinations.
- * Major characteristic peaks of species are underlined.
- * Peak is absent or with area of less than 2%, unless otherwise noted.
- * Peak overlapped with another.

جدول (٢): تحليل قطعيات قطاعى من لحوم البتلو والغنم بجهاز LC

وقت الاحتباس المناسب لفئة مصلى الايامين البحرى (RRT) ^a	٧b للمساحة الكلية للحوم الأبقار		٧ b للمساحة الكلية للحوم الغنم			
	كف Shoulder	قطع مستديرة Round	كف Shoulder	ضلع Rib	خصر Loin	رجل Leg
,٦١	٦,٢٨	٥,٢٦	١١,١	١١,١	١١,٤	١٣,٨
١,٠٠	٣,٢٤	٣,٤٧	—	—	—	—
١,٠٥	— ^c	—	٤,٣٠	٥,٣٨	٣,٠٢	٣,١٦
١,١٠	—	—	١٧,٥	١٢,٩	١١,٦	١٨,٦
١,١٦	١٨,٧d	١٨,٨	— ^c	٤,٩٥	٨,١٠	— ^c
١,٢١	٦,٠٧	٦,٤١	٢٤,٣	١٤,٠٠	٩,٠٥	١٤,٤
١,٢٦	١٠,٧	١٠,٠٠	—	—	—	—
١,٢٩	٣,٢٤	٣,٢١	١٤,٠٠	١٨,٤	١٩,٥	١٩,٧
١,٣٨	٣,٨٠	٣,٧٩	٥,٥٦	٤,٨٤	٦,٦٧	٣,٨٠
١,٦٦	٦,٣٣	٥,٧٣	—	—	—	—
١,٧٩	٣,٩٥	٤,٠٠	—	—	—	—
٢,٢٢	٦,٣٣	٥,٩٤	— ^c	٣,٢٣	٣,٣٣	٢,٩١
٢,٢٧	٦,٤٨	٧,١٥	٨,٧٣	٥,٧٠	٦,٣٤	٥,٢٠
٢,٧١	٤,٣٥	٤,٧٣	—	—	—	—
٢,٧٧	٤,٤٥	٤,٣٦	٤,٩٢	٤,٥٢	٥,٥٦	٤,١٨
٢,٨٦	٩,٦٧	٩,٦٧	—	—	—	—

* Relative to retention time of BSA Peak.

* Average of 2 determinations.

* Major characteristic peaks of species are underlined.

* Peak is absent or with area of less than 2%, unless otherwise noted.

* Peak overlapped with another.

جدول (٣) تحليل قطعات فطاس من لحوم الدجاج الرومي والبط بجهاز LC

وقت الاحتباس المناسب للأنسجة من الأليومين للبرق (RRT) ^a	٢b المساحة الكلية للحموم الدواجن				٢b المساحة الكلية للحموم الرومي				٢b المساحة الكلية للحموم البط			
	صدر Brest	جناح Wing	فخذ Thigh	رجل Leg	صدر Brest	جناح Wing	فخذ Thigh	رجل Leg	صدر Brest	جناح Wing	فخذ Thigh	رجل Leg
١,١٠	— ^c	—	—	—	٧٠,٠٠٠	٧٤,١	١٣,٠٠	١٤,٢	—	—	—	—
١,١١	٣٠,٠٠٠ ^d	١٨,٤	٢٠,٣	٢١,٥	—	—	—	—	—	—	—	—
١,٢١	—	—	—	—	٧,٠٠٠	— ^e	٢,١٠	٣,٣٠	٢١,٧	٢٢,٧	٢٢,٥	٢٢,١
١,٤٠	—	—	—	—	١٨,٨	١٨,٢	٧,٩٠	١١,٢	—	—	—	—
١,٤٥	١٤,٥	١٨,٦	٣٠,٨	٣٥,٣	١٦,٧	١١,٥	٢١,٤	٣٥,٥	٧,٣٣	١٠,١	— ^e	— ^e
١,٤٨	—	—	٢٢٢,٩	—	—	—	—	—	٧,٥٠	١١,٠٠	٢٨,٦	٢٤,٧
١,٥٢	١٦,٧	٧,٨٦	—	٧,٦٤	٨,٩٣	١٣,٧	١٤,٠٠	٩,٧٢	١٨,٣	١١,٠٠	١٠,٨	١٢,٩
١,٦١	٣,٨٧	٢,٨٦	٢,٢٧	٢٢,٠٠	٣,٦٤	٢,٨٢	٢,٠٠	٢,٠٠	—	—	—	—
١,٧٢	—	—	—	—	—	—	—	—	٧,١٧	٨,١٣	٥,٣٠	٤,٩١
١,٧٩	—	—	—	—	—	—	—	—	٥,١٧	٥,٨٨	٤,٣٤	٢,٨٢
٢,١٠	٨,٠٠	٧,١٤	٤,١٠	٦,٠٠	٥,٠٠	٥,٢٥	٤,٥٧	٤,١٠	٦,١٧	٦,٨٦	٤,١٠	٤,٩١
٢,١٧	—	—	—	—	—	—	—	—	٣,٨٣	٢,٥٢	٢,٥٣	٢,٠٠
٢,٤٠	٦,٨٠	٨,٢٩	٤,٨٥	٦,١٨	٥,١٥	٧,٥٥	٤,٨١	٥,٣٨	—	—	—	—
٢,٤١	٦,٢١	٥,١٤	٤,١٠	٣,٦٤	٥,٩١	— ^e	— ^e	— ^e	٣,١٧	٥,١٠	٤,٨٢	٥,٠٩
٢,٥٩	—	٦,١٤	٢,٠٠	٥,١٠	—	—	—	—	—	—	—	—
٢,٦٥	١١,٣	٧,٧١	٦,٢١	٨,١٨	٦,٥١	١٠,١	٧,٠٠	٣,٥٠	٩,١٧	١٠,٨	١٠,٦	٩,٦٥

* Relative to retention time of BSA Peak.

* Peak is absent or with area of less than 2%, unless otherwise noted.

* Peak overlapped with another.

* Average of 2 determinations.

* Major characteristic peaks of species are underlined.

جدول (٤): تحليل لحوم الأبقار المختلطة بجهاز LC

وقت الاحتباس المناسب لقمة مصلى الألبومين البقرى (RRT)a	الملاحظة الكلية						
	Beef بقرى	Beef بقرى pork مختزير	Beef بقرى veal بتلو	Beef بقرى Lamb غنم	Beef بقرى chicken دجاج	Beef بقرى turkey رومى	Beef بقرى Duk بط
٠,٦١	١٠,٨٢	٦,٧٥	٧,١٧	١١,٨	٥,٥٤	٧,٠٤	٨,٦٨
١,٠٠	٢,٠٠	—	٣,٩٤	—	—	—	—
١,٠٥	٢,١٠	—	—	٥,٢٩	—	١٢,٠٠	—
١,١٠	٧,٦٥	١٣,٥٠	٢٥,٧	٤,٦٤	١٩,٧	٤,١٣	٧,٣٦
١,٦	١٣,٦	١٤,٩	١٢,٠٠	١٧,٦	١٠,٢	٦,٧٧	١٧,٠٠
١,٢٦	٢,٩٨	١٨,٤	٤,٣٠	٢,٠٧	—	—	١٠,٢
١,٢٩	٣,٧٨	—	—	٩,٠٠	٢,٥٤	٥,٢٠	—
١,٣٨	—	٢,٣٤	—	٥,٥٠	—	—	—
١,٤٥	١٢,٩	٨,٠٥	٧,٢٤	٨,٠٧	٩,٤٠	١٠,٥	١٨,٦
١,٥٢	—	—	—	—	٧,٤٠	١٢,١	٤,٩٤
١,٦٦	—	—	—	—	٣,٠٨	٢,٠٠	—
١,٧٢	—	٣,٤٨	—	—	—	—	—
١,٧٩	٤,٢٢	—	٣,٥٤	٥,٠٧	—	٢,٩١	٥,٠٣٤
١,٨٨	٢,٢٤	—	٣,١٥	—	—	—	—
٢,١٠	—	٢,٢٧	—	—	٣,٥٥	٢,٧٤	—
٢,١٧	—	—	٣,٥٤	—	—	—	—
٢,٢٢	٢,٩٢	٣,٠٠	٨,٥٠	٤,٢٩	٣,٢٨	٢,٥٤	٢,٥٧
٢,٢٧	٦,٧١	٣,٧٧	—	٥,٤٣	٣,٤٢	٣,٤٤	٣,٨٩
٢,٤٠	—	—	—	—	٣,١٣	—	—
٢,٤٦	—	—	—	—	٢,٥٩	٢,٤٣	—
٢,٥٩	—	٢,١٤	—	—	—	—	—
٢,٦٥	—	٢,٢٧	٢,٧٦	—	—	—	—
٢,٧١	٤,٧٧	٢,٣٤	—	٣,٦٦	٢,٠٣	٢,٣٨	—
٢,٧٧	٦,٢١	٥,٥٨	٧,٧٢	٤,٠٠	٣,٤٧	٣,٦٠	٤,٢
٢,٨٦	٥,٧١	٣,٣١	٧,٠٥	٥,١٤	٣,٠٨	٣,٣٩	٣,٩٦

* Relative to retention time of BSA Peak.

* Average of 2 determinations.

* Major characteristic peaks of species are underlined.

* Peak is absent or with area of less than 2%, unless otherwise noted.

جدول (٥): تحليل لحوم الخنزير المختلطة بجهاز LC

وقت الاحتباس المناسب لقمة مصلى الألبومين البقرى (RRT) ^a	Z للمساحة الكلية					
	الخنزير	خنزير ويتلو	خنزير وغنم	خنزير ودواجن	خنزير ورومى	خنزير ويط
٠,٦١	٢,٠٤	٣,١٣	٦,٩٧	—	—	—
١,٠٠	—	٢,٧٢	—	—	—	—
١,٠٥	—	—	٢,٦٩	—	—	—
١,١٠	١٠,٨	—	٦,٢٧	—	٢١,٨	٤,٤٢
١,١٦	٤,١٢	٢٧,٠٠	١٤,٨	٢٢,٠٠	—	—
١,٢١	١٢,٨	—	—	٦,٨٠	٧,٧٦	٢٥,٩
١,٢٦	٣٢,٨	٣٠,٢	٣١,٠٠	١٦,٢	١٧,٧	٢٢,٢
١,٣٨	٢,٥٠	٢,٨٠	٦,٦٧	—	—	—
١,٤٥	—	—	—	١١,٢	١١,٣	٦,٩٧
١,٥٢	—	—	—	١٠,٣	٥,٣٣	٦,٠٦
١,٦٦	—	—	٣,٦٦	٢,٨٦	٢,٣١	—
١,٧٢	٦,٤٦	٤,٦٣	٣,٩٨	٣,٨٦	٢,٩٣	٥,٩٦
١,٧٩	—	٣,٣٨	—	—	—	٢,٢٢
٢,٠٠	٢,٤٨	٣,٨٣	٤,٧٦	٢,٢٤	—	—
٢,١٠	٦,٣٥	٦,٠٠	—	٦,٣٩	٢,٤١	٣,٢٣
٢,١٧	—	—	—	—	—	٢,١٤
٢,٢٢	٤,٣٨	٢,٠٠	٦,٤٧	—	—	٢,١٤
٢,٤٠	—	—	—	٣,٦١	—	—
٢,٤٦	—	—	٢,٠٧	٣,٢٠	٣,١٣	—
٢,٥٩	٣,٧٥	٤,١٤	٢,٠٠	—	٣,٥٤	—
٢,٦٥	٣,٥٤	٣,٣٠	٤,٢٣	٨,٨٤	٨,٣٦	٧,٤٧
٢,٧٧	٣,٣٣	٣,٥٤	٢,٠٤	—	—	٢,٣٢

* Relative to retention time of BSA Peak.

* Average of 2 determinations.

* Peak is absent or with area of less than 2%, unless otherwise noted.

* Major characteristic peaks of species are underlined.

* Peak overlapped with another.

جدول (٥): تحليل لحوم الخنزير المختلطة بجهاز LC

وقت الاحتباس المناسب لقمة معسل الاليومين البقرى (RRT) ^a	٪ للماحة الكلية					
	الخنزير	خنزير ويتلو	خنزير وغنم	خنزير ودواجن	خنزير ورومي	خنزير ويط
١,١٠	—	٢٠,٠٠	٨,٠٠	—	—	١٤,١
١,١٦	٣٠,٠٠	—	١٨,٩	—	١٨,٥	—
١,٢٦	—	٢,٠٠	—	٢٦,٧	١٢,٢	١٢,٣
١,٤٥	١٤,٥	١٦,٧	٢٢,٨	٧,٣٣	١٦,٢	٨,١٦
١,٤٨	—	—	—	٧,٥٠	٧,٩٣	—
١,٥٢	١٦,٧	٨,٩٣	١٣,٣	١٨,٣	٨,١٢	—
١,٦٦	٣,٨٧	٣,٦٤	٤,٣٨	—	٢,٤٥	٢,٥٢
١,٧٢	—	—	—	٧,٦٧	٢,٤١	٢,٤٣
١,٧٩	—	—	—	٥,٦٧	٢,٩٨	٢,٣٣
٢,١٠	٨,٠٠	٥,٢٥	٨,٨٦	٦,٦٧	٧,١٦	٧,٧٧
٢,١٧	—	—	—	٣,٨٣	—	—
٢٢,٤٠	٦,٨٠	٧,٥٥	٥,٨١	—	٤,٤٠	٤,٨٥
٢,٤٦	٨,٢١	—	٤,٥٧	٣,١٧	٤,١٤	٤,٥٦
٢,٦٥	٦١,٣	٦,٥١	٩,٢١	٩,١٧	١٠,٧	١١,٨

* Relative to retention time of BSA Peak.

* Average of 2 determinations.

* Peak is absent or with area of less than 2%, unless otherwise noted.

* Major characteristic peaks of species are underlined.

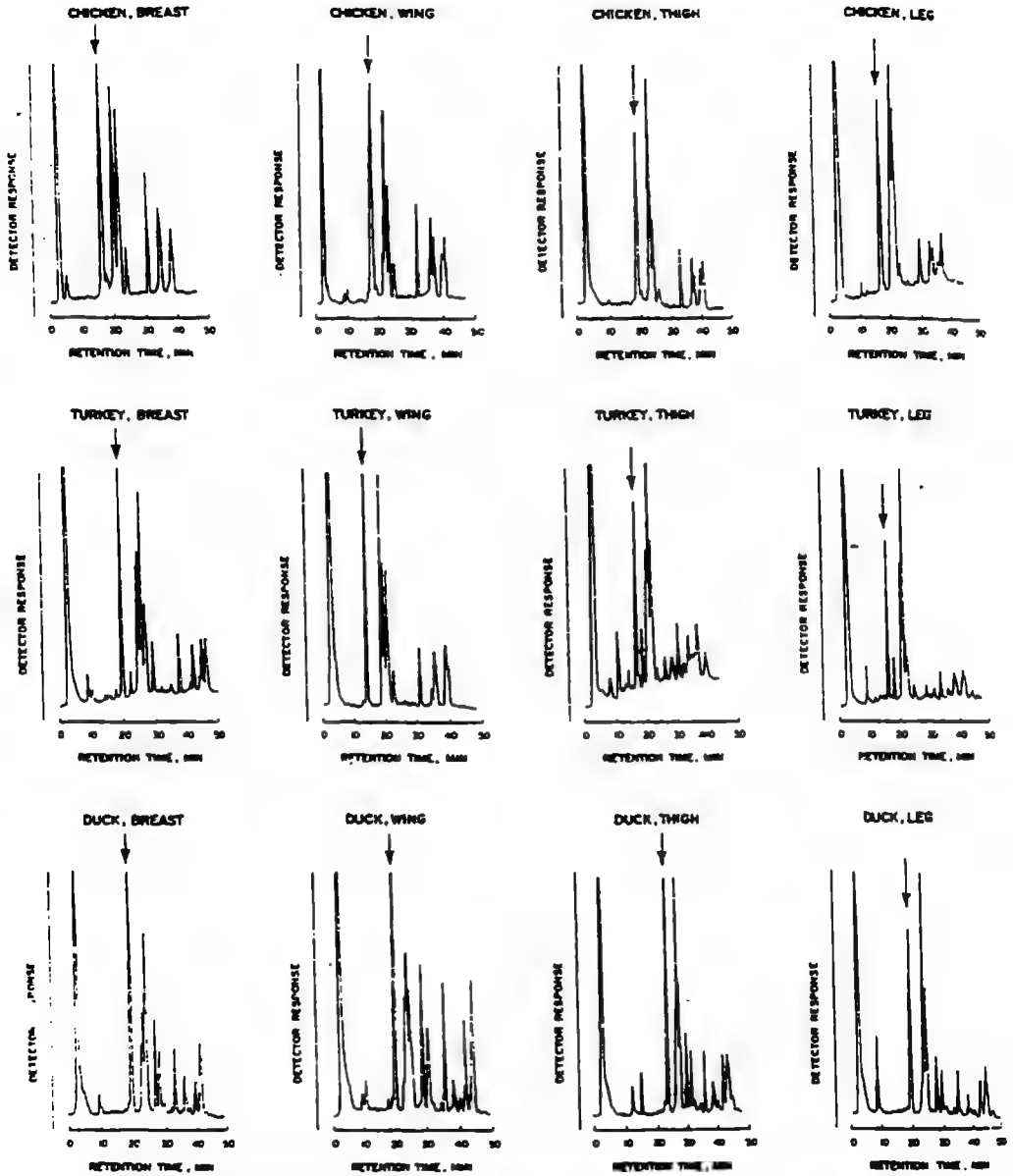


Figure 2. Chromatograms of chicken, turkey, and duck parts. Arrows indicate species-specific peak(s).

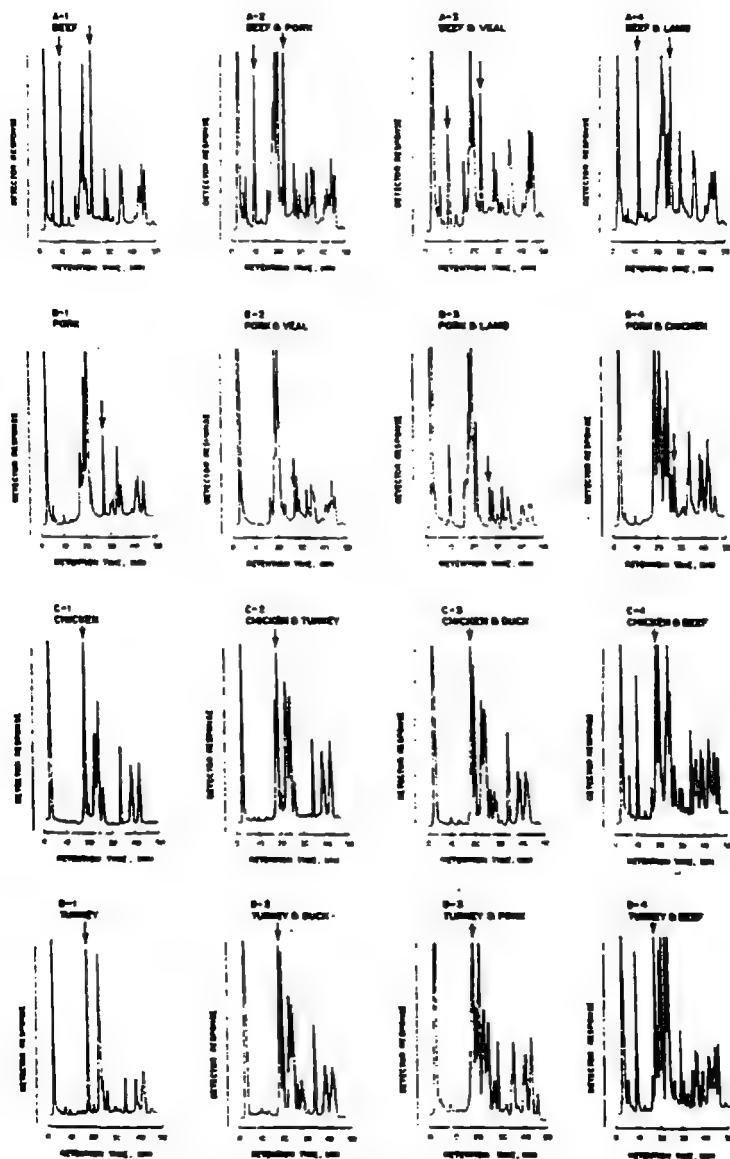


Figure 3. Chromatograms of meat and poultry mixtures. Arrows indicate peak(s) specific to beef, pork, chicken, and turkey.

المراجع:

- (1) Thompson, R. R. (1961) *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **44**, 787-787.
- (2) Scopes, R. K. (1968) *Biochem. J.* **107**, 139-150.
- (3) Hoyem, T., & Thorson, B. (1970) *J. Agric. Food Chem.* **18**, 737-739.
- (4) Babiker, S. A., Glover, P. A., & Lawrie, R. A. (1982) *Meat Sci.* **5**, 473-477.
- (5) Kim, H., & Shelef, L. A. (1986) *J. Food Sci.* **51**, 731 et seq.
- (6) Kaiser, K. P., Matheis, G., Kmita-Durrman, C., & Belitz, H. D. (1981) *Sci. Tools* **28**, 5-7.
- (7) King, N. L., & Kurth, L. (1982) *J. Food Sci.* **47**, 1608-1612.
- (8) Sinclair, A. J., & Slattery, W. J. (1982) *Aust. Vet. J.* **58**, 79-80.
- (9) Hayde, A. R. (1977) *J. Food Sci.* **42**, 1189-1192.
- (10) Hayde, A. R. (1977) *J. Food Sci.* **43**, 476 et seq.
- (11) Hayde, A. R. (1977) *J. Food Sci.* **44**, 494-500.
- (12) Cook, H. R., & Sturgen, J. D. (1966) *J. Assoc. Off. Anal. Chem* **49**, 877-880.
- (13) Saeed, T., Abu-Dagga, F., & Abdul-Rahman, H. (1986) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **69**, 999-1002.
- (14) Medina, M. B., & Philips, J. G. (1982) *J. Agric. Food Chem.* **30**, 1250-1253.

**طريقة اليسا المعدلة للتعرف على اللحوم الطازجة
باستخدام مضادات الاصل الخام وثابتة
التفاعل المناعى**

**A Modified Indirect ELISA procedure for Row Meat
Speciation using crude. Anti-speices, Antisera and
stabilised Immunoreagents.**

**Sheila J. et al AFRC Institute of Food Research,
Bristol Laboratory, Langford, Bristol BS 187 Dy 1985.**

طريقة اليسا المعدلة للتعرف على اللحوم الطازجة باستخدام مضادات الامصال الخام وثابتة التفاعل المناعى

أساس الطريقة:

طريقة الارتباط الانزيمى بالامتصاص المناعى ELISA معروفة جيداً كأداة لتشخيص القيمة الغذائية فى المختبرات (Food quality control).

وعلى ذلك أن نوع الاختبار المناعى يعتمد أساساً على اتخاذ الأجسام المضادة مع الانتيجينات عند سطح الامتصاص المناعى مكوناً مركب خليط يظهر خصيصاً بدرجة عالية ومطلوب التعرف أو تعيين مكونات هذا الخليط المشترك مثل مستخلصات الغذاء فى مساحة التعرف على نوع اللحوم المختلفة بطريقة اليسا (ELISA) وهى غير معتمدة أساساً على تعيين نوع اللحوم غير المعاملة حرارياً.

الطريقة غير المباشرة لطريقة ELISA

متعددة الاستخدامات إلى حد بعيد وتستخدم فى صورة تحليل مبسط لمختلف اللحوم غير المصنعة ومنتجات اللحوم الخام.

التجربة Experimental

★ تحضير مضادات الامصال لمضادات الاتواع المترسبة:

Preparation of precipitating anti-species antisera

- ١- تحصين (immunised) الغنم ضد أمصال البيومين الأبقار (BSA) والخيول (ESA) والخنزير (PSA).

- ٢- تجمع مضادات الأمصال تبعاً للطريقة المشروحة بواسطة العالم Mageau وآخرون مستخدماً الانتشار المناعى للأجارجيل.
- ٣- تختبر استجابة مضادات الأجسام ضد الانتيجينات النقية فى محلول مائى (١ ملجم/ ملل).
- ٤- المصل الطبيعى يخفف حتى ٨ أضعاف فى محلول فيسولوجى.
- ٥- لم يشاهد تداخل تفاعلى متافر معين واضح لهذه الطريقة.
- ٦- خطوط الترسيب يتحصل عليها فقط ضد الأنواع المتماثلة (homologous).

★ تحضير أقراص مضادات الأجسام الثابتة:

Preparation of stabilised antibody discs

- ١- مضادات الأمصال لمضادات الأنواع الثابتة توضع على أقراص ذات قطر ٦ ملم من ورق الترشيح .
- ٢- طريقة العالم Magau وآخرون طورت كما يأتى ٢٠ ميكرو لتر من كل من مضادات الأمصال لمضادات الأنواع (غير مخففة) توضع على أقراص ورقية وتفرد على طبق بتردش مسطح.
- ٣- بعد التجفيف السطحى فى درجة حرارة الغرفة لمدة ١-٢ ساعة للأقراص تجمد - تجفف طول الليل تحت التفريغ ثم تخزن فى زجاجات محكمة الغطاء عند درجة حرارة ٤° س.

★ تحضير مستخلصات اللحوم وتثبيت القياسات:

Preparation of meat extracts and stabilised standards

- ١- العينة تجهز لطريقة ELISA من عينات ممثلة للحوم عشوائية.

- ٢- يجنس خليط من لحوم البقر والخنزير (٣ - ١٠ ٪) فى الماء أو محلول ملحي (٢٠ جرام لحم إلى ٨٠ ملل سائل Ca ٦٠ إس)، ثم يرشح.
- ٣- الراشح إما يستخدم مباشرة أو يجمد فى عينات كل منها ٥ ملل أو يجفف بالتجميد حتى الاستخدام فيما بعد كقياسات لبُنية العينات كما هو مطلوب بتركيز ٦٠ - ٦٥ ملم / ١٠ ملل من الماء.
- ٤- مستخلص حقيقى وآخر يحضر من مادة مفرزة (exudate) من أنسجة اللحوم الطازجة المذابة من التجميد (نقط) بعد التخفيف (١: ١) بماء مقطر ويرشح.
- ٥- يحضر ٢٠ ميكرو لتر من المادة الثانية من على أقراص الورق الماص كما سبق ذكره.

كواشف الـ ELISA reagents

- ١- محلول محايد من الكربونات والبيوكربونات (B) ذات أس هيدروجينى ٦, ٤ لتحصين مضادات الأجسام أو محلول غسيل من الفوسفات الملحي.
- ٢- توين ٢٠، PBST ذات اس هيدروجينى ٢, ٧ وانزيم كمادة خاضعة لفعل خميرة ما (Substrate) لطور التحضين (محلول سيترات الفوسفات المحايد ذات أس هيدروجينى ٥) يحضر مع Analar grade chemicals.
- ٣- أنواع من الألبومين النقى من البيروكسيد IgG Rabbit antigoats، وبيروكسيدز IgG conjngates - antirabbit - goat.
- ٤- ٣، ٣، ٥، ٥، تتراميثيل بنزين (TMB) انزيم substrate.

٦- مضادات الأمصال لمضادات الأنواع rabbit precipitating ضد البقر، ضد الخيل، ضد الخنزير، ضد الغنم/ الماعز.

★ تحضير المصل الطبيعى للحيوانات المختلفة:

يحضر أمصال البقر والخيول والخنزير والغنم من دم الحيوانات المذبوحة فى المسالخ المصرح لها بذبح الحيوانات فيها تحت مراقبة بيطرية جيدة.

★ أمصال مضادات الأجسام لمضادات (أنواع الحيوانات المعالجة:

Anti-species antibody "blocking" treatment

١- تنقع أقراص الأجسام المضادة لنوع الأغنام فى محلول PST المحتوى على البيومينات متغيرة الخواص (١ ملم/ ملل ca) مثال: قرص مضاد للخنزير يضاف إلى ٢٠ ملم PBST (يعادل ١ : ١٠٠٠ من محلول العمل) المذاب فى ٢٠ ملجم فى كل من البيومينات البقر، الغنم والخيول.

٢- ترج المحاليل بلطف أثناء التحضين لمدة ١ - ٢ ساعة عند درجة حرارة ٢٠ - ٢٥° س (درجة حرارة الحجرة).

٣- حالات كتل مضادات الأمصال تعطى استجابة مناسبة خاصة لكل نوع بينما تقل التداخلات التفاعلية إلى أقل ما يمكن (٢٠٪ قيمة إمتصاص متماثلة) تثبت على لوح خشبى مصمم مثل رقعة الشطرنج للمعايرة حيث تؤثر على العلاج المتغير وتخفيف مضادات الأجسام عند المقارنة.

٤- كل نوع من مضادات الأمصال يخفف بالترتيب من ١ : ٥٠ إلى ١ : ٦٠٠ فى PBST ، وتخلط بأحجام متساوية لثلاث محاليل من الأليومينات المختلفة (تحتوى على ٢ ملجم - ١ ملجم - ١٠٠ ميكروجرام أو ١٠ ميكروجرام/ ملم من كل نوع) فى نفس المحلول المخفف.

٥- يحضن المحلول كما سبق قبل الاستخدام فى حفر مناسبة من شرائح

ELISA قبل تغطيتها بمختلف الأليومينات، المصل العادى أو مستخلصات اللحوم.

٦- مضادات أجسام الأرانب التجارية (ترتفع ضد بروتينات مصل الدم) حيث تعالج كل واحدة منها فى محاليل مختلفة من المصل العادى بنفس الطريقة مثل ١٦ ميكرو لتر من مضادات الأمصال مضاد للخنزير (Anti-pig antiser-um) (غير مخفف مثل المجهز) وكانت البيتيدات فى محلول PBST (١٣,٥ ملل)، المصل العادى للبقر (٠,٧٥ ملل)، والمصل العادى للغنم (٠,٧٥ ملل) والمصل العادى للخيول (٠,٧٥ ملل).

٧- المقادير الضخمة تخفف مضادات الأجسام بالتسلسل ضد مختلف التركيزات لمختلف العلاجات على شرائح اليسا (ELISA) قبل تغطيتها بمختلف أنواع الأمصال المختلفة أو المتشابهة (١ : ١٠٠٠ تخفيف) أو مستخلصات اللحوم.

★ طريقة اليسا (ELISA)

١- طريقة اليسا غير المباشرة تودى إلى تقدير التأثير قبل المعالجة بطريقة: اليسا لمختلف مضادات الأمصال لمختلف الأنواع غير النقية ولتحضير الاستخدام اللاحق (المعالج وغير المعالج) كما فى اليسا أولا كواشف مضادات الأجسام تستخدم للتفريق بين كل الأنواع المتشابهة.

٢- تتبع بخطوات أساسية من الطريقة الأساسية باستخدام ٩٦ حفرة من شرائح اليسا وتخضع فى درجة حرارة ٢٣° س (درجة حرارة الحجر) لمدة ساعة فى جميع المراحل ما عدا المادة الخاضعة النهائية للإنزيم (enzyme substrate) تخضع فى درجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة قبل النتيجة.

٣- موازيا لهذه الطرق التى تجرى لكل محلول مضاد للأجسام مضاد لكل نوع

تحت الاختبار (معالجة أو غير معالجة) مضادة لحساسية الحفر بأعداد أنواع الأليومينات المخففة بالتسلسل (من ٢٥ ميكروجرام/ ملل)، المصل الطبيعى (من ١ : ١٠٠٠) ومستخلصات اللحوم (من ١ - ١٠) مغطاة بمحلول محايد.

٤- فى هذا النظام «أولاً» يعين مضادات أجسام الأغنام بواسطة مضادات الماعز IgG بيروكسيدز المتحد، مستخدماً نصائح المصنعين ومضادات أجسام الأرانب الأخرى التى تعين بواسطة مضاد الأرانب IgG بيروكسيدز المنتج.

٥- المادة الخاضعة لفعل خمير ما (substrate) (TMB) ١٪ فى محلول substrate المحايد + ١٪ هيدروجين بيروكسيد) يترك التفاعل حتى يظهر بوضوح بالرؤية بظهور اللون الأزرق والناتج عن اللون الأصفر بعد معاملته بحمض الكبريتيك ١٢,٥ ٪.

٦- تقرأ قوة اللون (intensity) بقياس الامتصاص عند طول موجة ٤٥٠ نانومتر فى شرائح Micro-ELISA قوة اللون تدل على التفاعل الإيجابى لمضاد النوع الأول مضاد المصل (أو ارتفاع التداخل التفاعلى) واللون الباهت يدل على ضعف الاستجابة (أو التداخل التفاعلى).

٧- جميع الشرائح تحتوى على ضوابط حيث تقاس استجابتها باستخدام هذا النظام فى حالة مصل الغنم الطبيعى أو مصل الأرانب الطبيعى، بدلاً من (instead) مضاد الأنواع مضاد الأمصال تحت نفس ظروف الاختبار وتخفيف المعاملة المعالجة (treatment) نهاية كل فحص يجرى حفر كضابط were virtually colourless (١, ٠ < امتصاص) عند ١ : ١٠٠٠ تخفيف مع قليل من الاستثناء (Exception) بعض التجارب تحتوى على حفر blank لمضادات الأجسام PBST بدلاً من الأجسام المضادة الأولى) وتحديد نسبة إمكانية التداخل التفاعلى بالارتباط بالمضاد IgG الثانى.

٨- على القاعدة اليومية ضرورة فحص الحفر المغطاة بالانتيجين الصافي، مصلى أو مستخلص اللحوم، مع محلول مضادات الأجسام الإيجابية (AP) (مثل معالجة مضادات الأنواع لمضادات الأمصال في PBST) ومضادات الأجسام السالبة التفاعل (AN) (PBST) أو المصل المناسب مساوى للتخفيف المقابل لـ (AP). هذا يرجع إلى اختلاف خلفية لون الانزيم substrate، الاختلافات في الارتباط Non-Specific واحتمال التداخل التفاعلى أو cross-reaction للانتيجين الثانى IgG لمستخلصات اللحوم المتصلة على الطور الصلب قيمة امتصاص سليمة.

النتائج والمناقشات:

١- طريقة إنتاج مضادات الأمصال باستخدام الأغنام كحامل تتخذ الإجراءات الوقائية للحيوانات عالية التأثير باستخدام أنواع نقية من الألبومينات كإنتيجينات تنتج فى أنواع خاصة جيدة من البقر استجابة فى اختبارات AGID عن السابقة التى لوحظت باستخدام الأرانسب لإنتاج مضادات أمصال الألبومين البقرية. ومضادات أمصال الخنازير والخيل وجدت متساوية فى الخواص والحساسية (قادرة على تعيين أقل من ٠.٥٪ من نوع واحد من اللحوم عنها فى الآخر مثل الخنزير فى البقر أو العكس) بدون أى أولويات للمعالجة.

٢- جميع الثلاث مضادات الأمصال غير المعاملة تعطى استجابة ملائمة عالية غير مباشرة بطريقة ELISA (قيمة امتصاص < ١) لمضادة أنتيجينات الألبومين المتجانسة (HR) مدروسة حتى ١٠٠٪ لكل تخفيف والتفاعلات المتقاطعة Cross-reactivity (CR) نسبة HR عند نفس التخفيف يميل إلى التقليل أكثر عند نفس المستوى مثلاً CR يخفف إلى HR حيث يبقى ثابت الارتفاع وذلك لزيادة أنواع خاصة لمضادات الأجسام الموجودة.

٣- في بعض الحالات مثل مضادات BSA ضد ESA، مضاد ESA ضد BSA، التخفيف المؤثر وحده حرف لتخفيض CR إلى $> 20\%$ (هذا لعينات اللحوم وليس لتحليل اللحوم المخلوطة، whilst in othersss مثل مضاد PSA ضد BSA، ESA، CR ما زال مرتفعاً حتى 30% عند العوامل العالية التخفيف.

٤- الاستجابات المتعادلة ضد اليوميين الغنم النقى وجدت (منخفضة $> 15\%$) ما عدا عند معظم التركيزات المخففة لمضاد BSA (١ : ١٠٠ - ٨٠٠) المتوقعة في الحيوانات الوسيطة مثل الغنم حتى ١ : ١٠٠٠ يعطى المحلول العملى المخفف.

٥- اختبار مستخلصات اللحوم المركبة تتطلب تخفيض CR في العلاقة التماثلة مع التركيزات.

٦- معظم التأثيرات المتداخلة للمعاملة المعالجة من الأمصال المختارة اختبرت على قاعدة استجابة ELISA للشريحة المحتوية على انتيجن نقى.

٧- كل مضاد للأمصال تتطلب معالجة باليوميينات مختلفة الخواص عند تركيزات حتى ٥٠٠ ميكروجرام/ ملل فعلياً لتخفيض CR في تخفيف ١ : ١٠٠ - ٤٠٠ أعلى من ١ : ٨٠٠، CR 20% أو أقل بهذه المعالجة يظهر في شكل ١ من اليمين.

٨- التخفيف الموصى به هو ١ : ١٠٠٠، قبل الاندماج في المعالجة بحوالى ١ - ٢ ساعة بواسطة الأليوميينات مختلفة الخواص عند تركيز ١ ملجم/ ملل، CR مغلق كاملاً في التجربة ضد الانتيجين النقى.

٩- لا يلزم إزالة زيادة الأليوميينات مختلفة الخواص أو منتجات CR من المخلوط المحضن لأن كل المخلوط في PBST مخفف ذو مضادات

الأجسام الحرة لأنواع معينة فقط الوحيدة المحتوية على تفاعل داخلي في الطور الصلب وغير محدد الارتباط تمنع بحقن توين ٢٠ كمادة منظفة.

١٠- عمومًا التحضين ١ - ٢ ساعة عند درجة حرارة الحجرة متطلبة قبل الاستخدام الابتدائي بينما محاليل الأجسام المضادة المعالجة تتأثر بعد تخزينها طول الليل عند درجة حرارة ٤° س وتستخدم الآن بثقة لمدة ٣ أيام بعد التحضير.

١١- مضاد BSA، ESA، PSA مضاد للأمصال، المعالجة وغير المعالجة تقارن بمضادات الشرائح المحتوية على مستخلصات لحوم authentic species (البقر - الخيل - الخنزير والرومي والغنم) توضع في قرص منقوع في جسم من CB لمدة ساعة عند درجة حرارة الحجرة.

١٢- CR الملاحظ (شكل ٢) مستخدما مضاد الأمصال غير المعالج مشابه للنتيجة المحتوية على الانتيجين النقي، بينما مضاد الأمصال غير المعالج في نفس الاختبار مشابه للنتيجة المحتوية على ضد الانتيجين النقي والمحفز كمضاد للمصل في نفس الاختبار ويستج استجابة غير ثابتة بين الخواص المتماثلة والمختلفة الخواص.

١٣- هذا الاختبار ناجح في تعيين ثلاث أنواع من اللحوم (بقر، خيل، خنزير).

١٤- جدول ١ يلخص الاستجابة غير المباشرة في ELISA المتحصل عليها من مختارات من عينات لحوم الخنزير باستخدام مضاد مصل السبومين الخنزير عند التركيز الأقصى.

١٥- قيمة الامتصاص الصحيحة لعينة مسحونة (مستخلصة بالماء أو بالمحلول الملحي) تصل حتى ٩, ٠ - ١ ولا توجد علاقة تنافسية لمختلف محتويات الألبومينات والمقاسة بواسطة طريقة ELISA المطورة.

١٦- المستخلص المائى يعطى قيمة عالية بسيطة (متوسطة ٠,٦ ، ١ s.d. ، ٠,٣ عند المحلول للملحى (متوسط ٠,٩٧ ، ٠,٠٦ s.d. ، ٠,٠٦) وهذا اللون يتكون فى عينات اللحوم النقية من أى نوع تحت الاختبار وأعلى من ٥٠٪ فى معظم المخاليط البديلة، بينما ارتباط بقايا الأليومين بالارتباط المناعى بين أصناف البروتينات الذائبة فى الماء.

١٧- الاستثناء الوحيد باستخدام سوائل المفزة من الأنسجة الطازجة لعينة واحدة (تمتص من على الأقراص الضابطة والمطبعة مباشرة على الامتصاص المناعى بحجم مناسب من CB ، تعادل أقراص الخنزير الثابتة يعطى استجابة متماثلة منخفضة عند مقارنتها براشع مستخلصات اللحوم فى نفس التجربة assay. هذا قد يرجع إلى تداخل جزيئات الدهون Lipid أثناء خطوات التغطية الأولية أو تخفيض الأنتيجين، بينما التطبيق البسيط لعصارة اللحوم من خلال الاستخلاص بالماء عادة ينصح للمخاليط عندما يستخدم الاختبار غير المباشر ELISA على قاعدة وجود بقايا مصل البروتينات.

١٨- جدول ٢ يبين خطوط مستخلصات العينات والمراجع المستخدمة فى التجارب المستخدمة المختبرة وحساسية الطريقة (لحوم الدجاج المحتوى على لحوم الرومى والخنزير والبتلو فى المنتجات الخام).

١٩- كما هو سابقاً قيمة الامتصاص المتماثلة من لحوم الخنزير النقية، البقر، الخيل هى ك ٠,٩ وحدة أعلى من الاستجابة المتنافرة حيث أنه واضح من النتائج ظهور الألوان الأصفر الفاقع فى تباين الألوان الباهتة أو عديمة اللون تعطى نتائج غير مرغوب فيها، ما عدا الرومى المضاد للخنزير. هذا يمكن أن يخفض الاستجابة البسيطة فى التجربة لمعالجة مناسبة لتعزيد الحساسية.

٢٠- المستخلصات السائلة المختلطة تحتوى ما بين ٥ ، ٥٠٪ من نوع واحد فى الآخر (مثال لحوم خنزير، بقر) تغطى نفس الزيادة فى حساسية الامتصاص لتعيين الأنواع الملوثة كما هو موجود أصلاً من مستخلصات لحوم الخيل فى لحوم البقر مستخدماً مضادات المصل النقية.

٢١- تعيين لحوم الخنزير فى مختلف المخاليط من اللحوم البقرية المفرومة ممكن فى حدود ٣% تقريباً مثبتة على قاعدة زيادة فى قيمة الامتصاص للعينة ضد اللحوم البقرية النقية.

٢٢- إضافة ٣٪ من لحوم الخنزير فى لحوم بقرية تعطى قيمة امتصاص ٥٣ ، ٠ ، بينما المختبرة ضد PSA بالمقارنة إلى اللحوم البقرية (٠ ، ٧ ، ٠ ، ١٩ ، ٠ ، ٠٣ ، ٠ ، ١٦ ، ٠ ، ١٦ ، ٠ ، ١٧ ، ٠ ، ١٣) والرومى (٠ ، ٣٦) يمكن تعيينها ومن ناحية أخرى يسبب استجابة لحوم الرومى بمضاد PSA أعلى بسيط عن قيمة الاستجابة المتنافرة الأخرى. التجربة assay لا يمكن أن توضح الاختلاف بوضوح عند ٢ ، ٥٪ من لحوم الخنزير فى اللحوم البقرية (هذا يتطلب تخطى cross - reactivity إذا تطلبت الضرورة المشتركة معاملة لحوم الرومى لتعويض مضاد المصل الخاص أو يعزز اختفاء لحوم الدجاج.

٢٣- التفاعل الرجعى المنخفض التماثل (Correspondingly low cross - reactivity) نتيجة من مضاد لاختبارات ESA ويتضح أن الاستجابة لا تختلف كثيراً في هذه المخالط

٢٤- يتضح من الناحية العملية أن الفصل المرتفع لقيمة الامتصاص تتطلب تمييز لحوم الخنزير بدون تردد في اللحوم البقرية إما ٣,٠ وحدة أعلى للـ CR عن القياسات للأنواع الأخرى أو قيمة 40% من الاستجابة المتأصلة.

٢٥- هذه الطريقة غير كافية الحساسية لتعيين ٣٪ من لحوم الخنزير فى المقائق (السجق) المصنع من اللحوم البقرية ويمكن تحليلها بمضاعفة مضادات الأجسام بطريقة الساندوتش من ELISA.

٢٦- نفس أساس ما قبل اليا تحضين مضادات الأجسام تنجح فى التطبيق على بعض مضادات الأمصال التجارية (مضاد للخنزير ومضاد للخليل) التفاعل الرجعى المرتفع يظهر بوضوح حينما تستخدم مضادات الأجسام غير المعالجة.

٢٧- ما قبل المعالجة ينصح لكل مصل مضاد يشابه حالة المرحلة فى اليا المغلقة (blocking) وذلك للتمييز أو التفريق لانتيجينات الفيروس المسبب لمرض اللسان الأزرق blue tongue بينما فى هذه الطريقة يشبط منع التفاعل الرجعى غير المرغوب فيه rabbit anti - mous IgG enzyme conjngate (بإضافة ٢٪ حجم من المصل العادى النهائى، بقر أو غنم إلى مخفف مرتبط مباشرة قبل الاستعمال)، التجربة assay أعطت تأكيد تثبيط كامل لجمع التفاعل الرجعى لكل الأنواع من مضادات الأجسام مباشرة ضد كل بروتينات مصل الدم بما فى ذلك IgG، والمتطلب مزيد من الصرامة قبل العلاج للتريسيب المناعى لمضادات الأمصال. وبينما وأحياناً منتجات مضاد - البقر، مضاد - الغنم/ الماعز تعطى استجابة عالية ضد أمصال البقر، الغنم وتثبط التفاعل الرجعى بالمعالجات المشروحة سابقاً. وأيضاً تبدأ تثبيط الاستجابة المتماثلة. هذا يدل على وجود نفس epitopes لهما على الطور الصلب والانتيجينات المعالجة وقد يشرح لماذا بعض الباحثين يجدوا التفاعل الرجعى غير المتوقع باستخدام نفس مضاد - الغنم/ الماعز مضاد مصل فى اختبار الانتشار المناعى.

٢٨- يتضح أن مضادات الأمصال لتعيين اللحوم البقرية الخاصة زيادتها بالقرب

من التي لها علاقة بالحيوان الوسيط مثل (الغنم/ الماعز) للحصول على أقصى نتائج ثابتة بطريقة ELISA بين لحوم البقر والغنم (أو لحوم الماعز) أحسن دليل على اختبار AGID .

٢٩- وعلى النقيض طريقة نقاوة طريقة الفصل ترجع إلى مضادات الأجسام الخاصة بأنواع الامتصاص المناعي للأعمدة اللاحقة المطبقة في طريقة ELISA هذا التطوير لقاعدة طريقة ELISA يقلل التفاعل الرجعي خلال تفاعل الخليط تاركا مضادات الأجسام للأنواع الخاصة حرة لتدخل في التفاعل مع موقع الانتيجينات الخاصة عند الطور الصلب .

٣٠- كروماتوجراف الامتصاص المناعي يستهلك الوقت، غالى عند إنجاز معالجة التفاصيل الفنية .

٣١- يفضل استخدام مضادات الأجسام جافة على أقراص حفظ وتوضع مضادات الأمصال السائلة تحت المجمد لحين استخدامها .

٣٢- يراعى عدم حفظ مستخلص اللحوم على أقراص لمدة طويلة لتحللها .

٣٣- هذه الطريقة مبسطة وتحتوى على معالجة مضادات الأحسام وثبات القياسات على الأقراص الجافة .

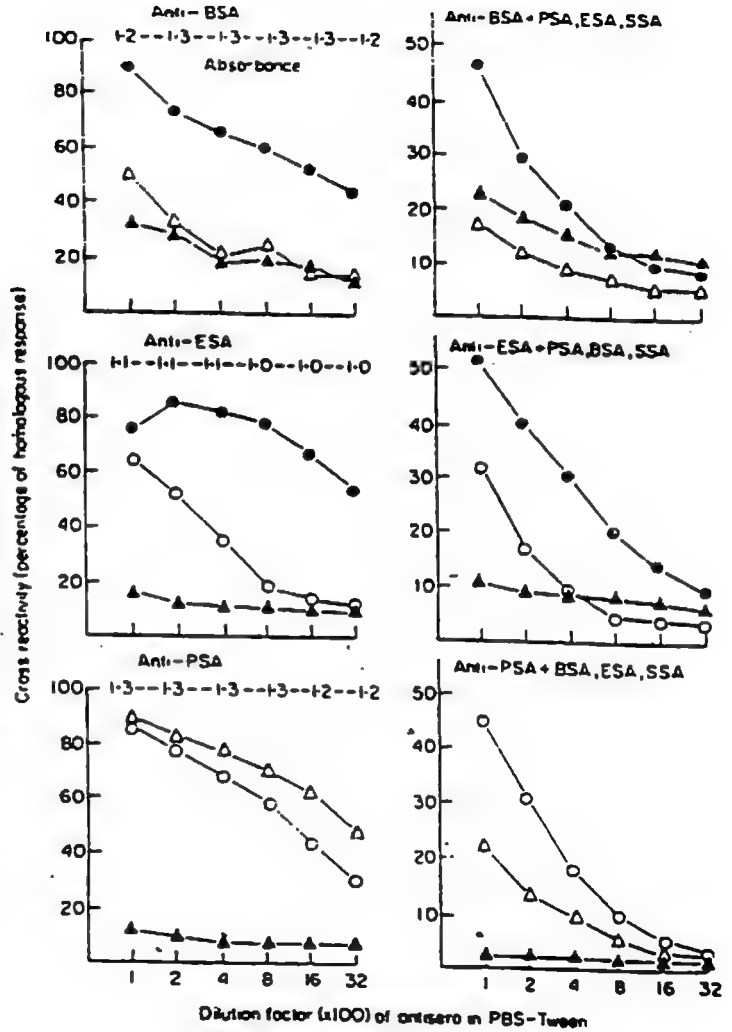


Figure 1. Optimisation of anti-body dilution and blocking treatment to minimise the heterologous cross-reactivity of anti-species antisera in indirect ELISA. Untreated antisera (left) raised against bovine BSA, (●), equine (ESA, △) and porcine serum albumin (PSA, ●) in sheep were tested in triplicate wells on ELISA plates coated with pure species albumins, including sheep (SSA, △) over a dilution range, 1:100-3200. Homologous absorbance values (means) shown for the untreated antisera were similar after treatment (right) and are represented as a maximum. Cross-reactivity is expressed as percentage of the homologous response. Treated antisera (right) comprised PBST solutions of anti-species antibody over the same dilution range plus 500 µg ml⁻¹ of each heterologous albumin, as shown.

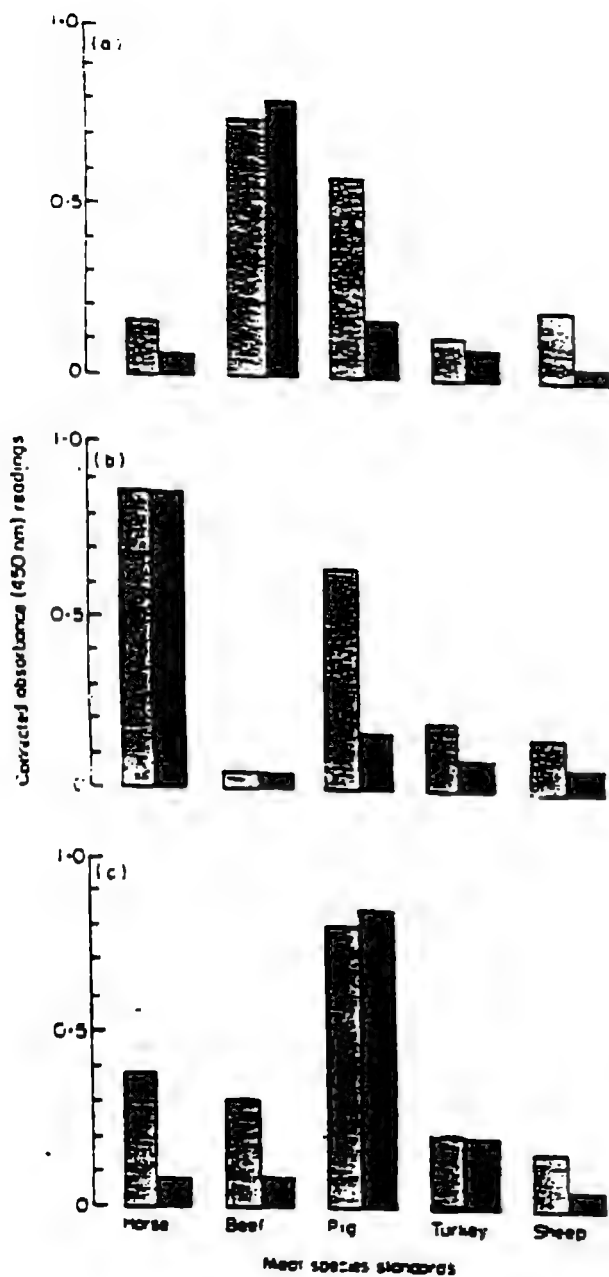


Figure 2. Species-specificity of sheep anti-species albumin antisera (pretreated as in section 2.2) in the differentiation of beef, pig and horse meats (applied to the plate as a disc): (a) anti-cow, (b) anti-horse, (c) anti-pig. (■), untreated; (▨), treated with heterologous albumin.

Table 1. Indirect ELISA response (absorbance) to pig meat samples using pretreated sheep anti-pig albumin serum

Species meat samples	Albumin content (mg g ⁻¹ of sample)	Extraction method		
		Saline (shaken well)	Water (homogenised)	Drip (in sample bag)
1 (v) ^a	0.32 ^b	0.95 ^c	1.07	—
2 (<i>m. biceps</i> <i>semotus</i>)	0.30	0.98	1.01	—
3 (v)	—	0.95	1.06	0.88
4 (v)	1.03	0.88	1.03	—
5 (v)	0.63	1.06	1.08	—
6 (v)	1.43	1.00	1.10	—
7 (s.d.)	—	0.97 (0.06)	1.06 (0.03)	—
8 (extract (v)	—	—	0.05	—
9 (disc ^d)	—	—	0.04	—
10 (extract (v)	—	—	0.03	—
11 (disc ^d)	—	—	0.05	—
12 (disc ^d)	—	—	0.78	—

^aMeat samples (removed from different carcasses at random) were trimmed of excessive fat and connective tissue and comminuted (Moulinette-S chopper).

v. Various muscles included in the sample were not defined.

^bAlbumin content of the comminuted samples was estimated by a competitive ELISA² against standard pig albumin (PSA) solutions (1 µg ml⁻¹–2 mg ml⁻¹).

^cAbsorbance: 450 nm values (corrected for background/antibody-blank response) are averaged duplicate readings.

^dSection 2.3.

Table 2. Indirect ELISA responses (absorbance) of pretreated sheep anti-pig, -beef and -horse sera. Results of one assay to test sensitivity with meat mixtures

Species*	Antiserum		
	Anti-Pig (PSA)	Anti-Beef (BSA)	Anti-Horse (ESA)
Beef (D)	0.07 ^a	1.09	0.08
Sheep (D)	0.16	0.10	0.16
Turkey (D)	0.36 ^a	0.15 ^a	0.26 ^a
Pig (D)	1.27	0.19	0.29
Horse (D)	0.13	0.12	1.35
Beef 1 (S)	0.19	1.18	0.17
Beef 2 (S)	0.03	1.08	0.01
Pig (S)	1.28	0.20	0.17
Horse (S)	0.17	0.17	1.17
Mixed liquid extracts			
0 Pig 100 Beef (1, above)	0.16	1.13	0.14
5 Pig 95 Beef	0.66	1.07	0.14
10 Pig 90 Beef	0.81	1.06	0.11
20 Pig 80 Beef	0.98	1.07	0.08
50 Pig 50 Beef	1.11	1.02	0.17
70 Pig 30 Beef	1.17	0.93	0.14
90 Pig 10 Beef	1.16	0.53	0.16
100 Pig 0 Beef	1.22	0.13	0.16
Pig/Beef mixtures ^c			
2.5% Pig (M)	0.35	1.13	0.07
3.0% Pig (M)	0.53	1.15	0.10
5.0% Pig (M)	0.72	1.17	0.12
10.0% Pig (M)	0.89	1.21	0.11
10.0% Pig (M)	0.84	1.13	0.17
Beef sausage (3% Pig)	0.29	0.70	0.14

D, Meat standard discs (section 2.3).

S, Mixed minced muscle samples, fat content <10%.

*S, Meat samples; D, meat standards.

^a Absorbance 450 nm values as Table 1.

^c Pig meat detection in minced beef (M) and beef sausage from different sources, prepared at the Institute.

^d Blocking treatment of antisera in this assay did not include turkey serum albumin. The possibility of cross-reactivity with poultry meat should be noted.

المراجع:

- 1- Clifford. M. N. *Immunoassays in Food Analysis* (Morris. B. A.: Clifford. M. N., Eds.) Elsevier Applied Science Publishers Ltd. London. 1985. 3-8.
- 2- Kang ethe. E. K.: Jones. S. J.: Patterson, R. L. S. Identification of the species origin of fresh meat using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *Meat Sci.* 1982, 7, 229-240.
- 3- Whittaker, R. G.: Spencet. T. L.: Copland, J. W. An enzyme-linked immunosorbent assay for species identification of raw meat. *J. Sci. Food Agric.* 1984, 34, 1143-1148.
- 4- Griffiths, N. M.: Billington, M. J. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for beef blood scrumi to determine indirectly the apparent beel content of beef joinsts and model mixtures . *J. Sci. Food Agric.* 1984, 35, 909-914.
- 5- Pattcrsor., R. M.: Whittaker, R. G.: Spencct, T. L. Improved species identification of raw meat by double sandwich cnzyme-linked immunosorbent assay. *J. Sci. Food Agric.* 1984, 35, 1018-1023.
- 6- Jones, S. J: Patcrson, R. L. S. Double-antiboldy ELISA for detection of trace amounts of pig meat in raw meat mixtures. *Meat Sci.* 1985. 15, 1-113
- 7- Jones, S. J: Patterson, R. L. S. Simplified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for qualitative meat species identification. In: *Biochemical Identification of Meal Species* (Patterson, R. L. S., Ed.) Elsevier Applied Science Publishers, London and New York, 1985, pp. 107-117.

- 8- Dobersstein, K-H.: Greuch, D. The preparation of specific antisera for the identification of meat of African Antelope species in the agar gel precipitation test. *Fleischwirtsch.* 1982, 62, 1011-10113.
- 9- Hayden. A. R. Immunochemical detection of ovine, porcine and equine flesh in beef products with antisera to species myoglobin. *J. Food Sci.* 1979, 44, 498-499.
- 10- Mageau, R. P.: Cutrufelli. M. E.: Schwab, B. Johnston. R. W. Development of an overnight rapid bovine identification test (ORBIT) for field use. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67, 949-954.
- 11- Hudson, L.: Hay, F. C. *Practical Immunology* (2nd edn). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1980, 238.
- 12- Anderson. J Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to blue-tongue virus. *J. Immunol Meth.* 1984, 73-74, 139-149.
- 13- Gleeson. L. J. Waket. P. R. Specificity controls on commercial serologic reagents for meat speciation by agar gel diffusion tests *Aust Vet J* 1984, 61, 165-166.

**طريقة الانتشار المناعي في التعرف على
أنواع لحوم الحيوانات**

**Immunodiffusion Technique for the Identification of
Animal species.**

Guy Fugate et: al J. of the AOAC, Vol. 54, No. 5, 1971

طريقة الانتشار المناعى فى التعرف على أنواع لحوم الحيوانات

أساس الطريقة:

طريقة الانتشار المناعى فى الأجارجيل تستخدم فى التعرف على أنواع لحوم الحيوانات. نموذج من الحفر وأوعية مقطعة من شرائح الأجار. الحفر والأوعية تحتوى على الانتجين ومضادات المصل على التوالى. انتشار الانتجين ومضادات المصل خلال الأجار نتيجة تكوين خط الترسيب (precipitin line). حينما يكون الانتجين - الأجسام المضادة فى أعلى حالتها، يعتمد التفاعل على وضع تكوين خطوط الترسيب فى علاقة كل منهما للآخر. إحدى عشر عينة من اثنى عشر عينة لحوم مخلوطة ثم التعرف عليها بالضبط بطريقة الانتشار المناعى فى الأجار جيل. هذا الاختبار سريع وبسيط لتأكيد وتعزيز النتائج. طريقة الترسيب الحلقي فى الأنوبة للتعرف على لحوم أنواع الحيوانات المختلفة.

الطريقة:

● تحضير العينة sample preparation

١- تحضير لحوم مفرومة من حيوانات معروفة وحيوانات غير معروفة معلومة الوزن.

٢- يحضر المستخلص بإضافة محلول ملحي (٨٥٪ صوديوم كلوريد) لمدة ١,٢ - ٢ ساعة بنسبة ٣ : ١ (w/v).

٣- يرشح المستخلص مباشرة بورق ترشيح نمرة ٤٢ قبل عملية التحليل.

٤- المستخلص يخزن تحت المجمد أو فى المجمد وهذا يتطلب إعادة الترشيح قبل الاستخدام.

● تحضير الأجار جيل Agar-gel preparation

- ١- يحضر ١٪ أجار جيل (ion agar No2).
- ٢- يسخن الخليط للدرجة الغليان.
- ٣- يرشح الخليط من خلال صوف رجاى أو من خلال ٤ طبقات قماش (cheese cloth)
- ٤- يؤخذ ١٠٠ ملل من الراشح ويوضع فى وعاء ذات غطاء (screw-cap).
- ٥- يعقم فى الأوتوكلاف لمدة ١٥ دقيقة عند ضغط ١٥ رطل.
- ٦- يبرد الأجار إلى درجة حرارة ٤٩ - ٥١ °س.
- ٧- يضاف مريثولات merthiolate إلى التركيز النهائى ١ : ٥٠٠٠.
- ٨- يوضع فى Tighten caps ويحفظ عند درجة حرارة الغرفة حتى الاستخدام.

● تحضير الأطباق plate preparation

- ١- يسخن الأجار مرة أخرى فى حمام مائى عند درجة الغليان.
- ٢- يوضع ٢٠ ملل فى أطباق بتردش بلاستيكية (٢٥ مم × ١٠٠).
- ٣- يبرد الأجار الصلب فى الثلاجة لمدة ٣٠ - ٦٠ دقيقة حتى يصل إلى أقصى ثبات.
- ٤- يقطع الأجار على هيئة حفر (شكل ١) ويزال الأجار الزائد بواسطة قطعة من القطن.
- ٥- تغطى حفر الأجار والوعاء بأجار منصهر.

٦- تحفظ الأطباق فى المبرد (الثلاجة) حتى أسبوعين فى حالة عدم وجود مجفف أو ظهور مواد نامية عليه.

• الشحن والتحضين Charging and incubation

١- توضع علامات على الأطباق المختارة للتعرف على العينة للتأكد من سلامة تفسير النتائج.

٢- يستخدم طبق لاختبار نوعين من الأنسجة معروفين مع العينة المجهولة.

٣- يضاف المستخلص المرشح (الانتيجين) إلى الحفر والأحواض المحتوية على مضادات الأجسام (antisera).

٤- يستخدم مضادات الأجسام التى تتفاعل مع الانتيجينات المتماثلة (انتيجينات نسيجية معروفة) شكل ٢.

٥- يعاد شحن الأطباق بالانتيجينات بعد ساعتين.

٦- تحضين الأطباق لمدة ١٨ - ٢٤ ساعة فى صندوق عالى الرطوبة (humidity) فى درجة حرارة الحجرة.

٧- بعد التحضين تفحص الأطباق والتعرف على خطوط الترسيب بوضعها على سطح أسود مع تسليط ضوء مباشر من الجانب.

٨- خطوط الترسيب تظهر بلون رمادى على الأجار الصافى.

٩- إذا لم تظهر خطوط الترسيب يعاد تحضينها لمدة ١٨ - ٢٤ ساعة ثم يعاد فحص الأطباق.

١٠- تغسل الأطباق بلطف بالماء لإزالة الفيلم من على سطح الأجار والبروتينات المترسبة فى الحفر والأحواض.

١١- منظر الأطباق واسكتش خطوط الترسيب توجد على worksheet.

• صباغة وحفظ كتل الأجار جيل

staining and preserving agardd bloks

- ١- ديلزة (dialyze) أطباق الأجار فى محلول ملحي محايد من الفوسفات عند أس هيدروجيني ٧, ٢.
- ٢- تغير الديلزة مرتين يوميًا لمدة ٣ أيام ومرة واحدة يوميًا لمدة يومين.
- ٣- يضاف ديلزة أخرى لمدة ٢٤-٢٨ ساعة فى ماء مقطر حمض (١, ٠ ٪ حامض الخليك) لإزالة زيادة الأملاح.
- ٤- تغسل الأطباق برفق شديد بالماء المقطر.
- ٥- توضع الأطباق غطاؤها مفتوح جزئيًا فى المبرد (الثلاجة) لمدة ٢٤ - ٣٦ ساعة ليسمح بخروج الماء من الأجار.
- ٦- يقطع الأجار إلى كتل وترفع تبعًا للمنطقة الخارجية (شكل ٣).
- ٧- ترتب الكتل ومن ضمنها الحفر وخطوط الترسيب.
- ٨- توضع كل كتلة على شريحة زجاجية للميكروسكوب ويوضع عليها علامة واضحة ويفحص للتأكد من وصف الأطباق الأصلية.
- ٩- تغطى الكتل بورق وات مان ثمرة ١ لتفادى وجود فقائيع الهواء بين الورق والأجار.
- ١٠- يستخدم أدوات حادة لقطع وإزالة الورقة المغطى بها الحفر فقط.
- ١١- تجفف الكتل حتى تصبح فيلم رقيق.
- ١٢- تبلل الورقة بالماء المقطر وتزال.
- ١٣- يغسل الفيلم بلطف بماء مقطر بواسطة قطن applicator لإزالة شعيرات الورق العالقة.

- ١٤- يستمر في تجفيف الأجار حتى يصبح فيلم رقيق جداً.
- ١٥- تصبغ الشرائح لمدة ١٥ - ٣٠ دقيقة بواسطة ponceau-R ثم يزال الزيادة من الصبغة بماء مقطر.
- ١٦- يزال لون الأجار (Decolorize) بتغيير الحامض الكحولي (١٪) حامض الخليك في (٧٠٪ إيثانول).
- ١٧- تجفف الشرائح بواسطة محلول أكسالات الأمونيوم ذات البلورات القرمزية.
- ١٨- يخفف ١ : ١٠٠٠ ca بحلول حامض كحولي.
- ١٩- يزال لون الأجار (Decolorize) حتى الكثافة المرغوب فيها بواسطة الحامض الكحولي.
- ٢٠- اللون الأزرق يضمحل قليلاً بعد التجفيف.
- ٢١- هواء جاف يمرر على الشرائح تحت غطاء رجاجى رائق وشفاف من mounting solution.
- ٢٢- الأجار فيلم يكون أزرق براق مع خطوط ترسيب حمراء وإذا كانت الرغبة في التصوير يستخدم فيلم أرثوكرماتيك orthochromatic تظهر خطوط الترسيب غامقة على خلفية بيضاء.

• تفسير تفاعلات الترسيب Interpretation of precipitin reaction

تفسير النتائج تعتمد على تكوين الخطوط بالانتيجين المعروف وغير المعروف (شكل ٤).

- ١- توضيح خط التطابق مثلاً خط الترسيب يتكون عندما تكون الانتيجينات متماثلة (شكل ٤).

٢- رؤية جزئية لخطوط التماثل، مثلا الخطوط التي تكونت حينما تكون المستخلصات متشابهة ولكنها تختلف في تماثل البروتينات التي تتفاعل مع نفس مضادات المصل (antiserum).

٣- شكل (٥) يوضح التفاعل النموذجي مع الانتيجين غير المعروف واثنين من الانتيجينات المعروفة، يرى تماثل الخطوط الكاملة والجزئية.

٤- الانتيجين المجهول u يستمر في تكوين رسم الموجة مع الانتيجين المعروف a لتماثل تكوين الخطوط.

٥- الخطوط المتكونة بالانتيجين المعروف b تظهر كمنبه لتكوينها بالانتيجين a ، u والخطوط المتشابهة والجزئية التماثل.

٦- شكل (٥) أيضاً يوضح رسم تكوين خطوط الترسيب عندما تحتوي العينة أنسجة الانتيجينات من نوعين (حفر ba).

٧- مضادات الأمصال في معظم الحالات لا تتفاعل مع الانتيجينات المتنافرة وخطوط جزئية التماثل لا تكون. هذه توجد عندما تكون أنواع الحيوانات (مثل البقر والغنم) ذات القرابة.

٨- شكل (٣) يوضع المنطقة المحتوية على الانتيجين التماثل بين نقطتين أو أكثر.

٩- أربعة من ٦ مناطق لها تفاعلات للانتيجينات مع مضادات الأمصال A (antiserum)، اثنين من ٤ مناطق توجد في وضع التفاعل مع مضادات الأمصال B . والمنطقتين الباقيتين (٢، ٤) كضابط للحفر.

١٠- مخاليط الانتيجينات a ، b في الحفر علامة ba تكون في وضع التفاعل لنوعين من مضادات الأمصال وخطوط الترسيب الموضحة التي توجد حينما تحتوي العينة على أنسجة من نوعين.

التجربة Experimental

- ١- اثنى عشر عينة من اللحوم المفرومة من مختلف الأنسجة. كل عينة تزن نصف رطل جدول (١) يبين النسبة المئوية لتركيبات عينات اللحوم المفرومة.
- ٢- العينات الخاضعة لاختبار الترسيب الحلقى فى الأنبوبة والتائج تؤكد بواسطة اختبار الانتشار المناعى.
- ٣- نتائج اختبار الترسيب الحلقى تعين باختيار مضادات الأمصال والانتيجينات المستخدمة فى اختبار الانتشار المناعى.
- ٤- مضادات الأمصال المتجة من الأرانب بطريقة بروم (prooms).
- ٥- مضادات الأمصال المجموعة من دم أرانب merthiolated عند ١ : ٥٠٠٠ ، يرشح من خلال غشاء ترشيح مساميته ٠,٤٥ فى رجاجات معقمة مفرغة سعة ٣٠ ملل. وتخزن تحت المجمد فى الثلاجة حتى الاستعمال.
- ٦- كذلك مضادات الأمصال المستخدمة لأنبويتين اختبار الترسيب الحلقى واختبار الانتشار المناعى.
- ٧- سرعة التفاعل وتخفيف مضادات الأمصال ١ : ٤ للاختبار الحلقى ويخفف ١ : ٢ أو ١ : ٣ لاختبار الأجارجيل.
- ٨- تجهز الشرائح (٢/ عينة) ويضاف الانتيجينات ومضادات الأمصال المناسبة إلى الحفر والأحواض.
- ٩- بعد ٢٤ ساعة من التحضين فى درجة حرارة الحجرة ويلاحظ خطوط الترسيب فى الشرائح شكل (٢).
- ١٠- جميع العينات ما عدا واحدة تم التعرف عليهم بالضبط عينة 1018 تحتوى فقط على أنسجة غنم وفشرت من مخلوط أنسجة بقرية وغنم.
- ١١- جدول (٢) يبين نتائج كل عينة مختبرة.

★ الخلاصات والتوصيات:

- ١- عينة من اثنى عشر عينة تخضع لعدم التعرف عليها بالضبط وذلك يعتقد أن اختبار الانتشار المناعى مؤثر للتعرف على مخاليط اللحوم الحيوانية وتعضد مباشرة باختبار الترسيب الحلقي .
- ٢- هذه الطريقة بسيطة وسريعة ويوصى باستخدامها .

FUGATE AND PENN. SEROLOGICAL IDENTIFICATION OF ANIMAL SPECIES

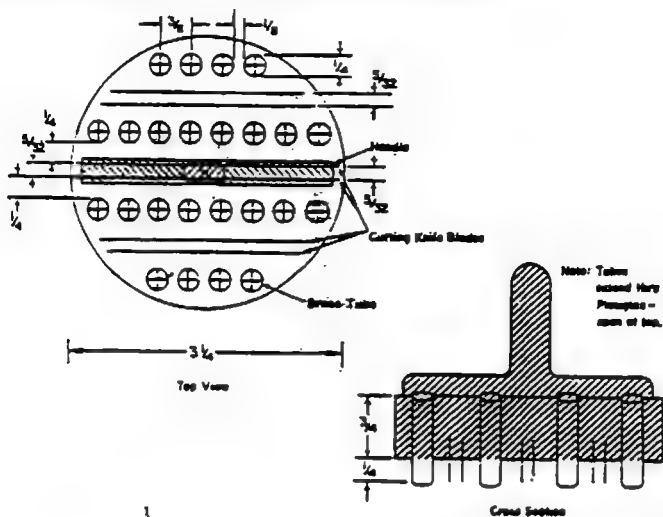


FIG. 1—Cutting tool used to cut patterns of walls and troughs in agar-gel.

شكل (١)

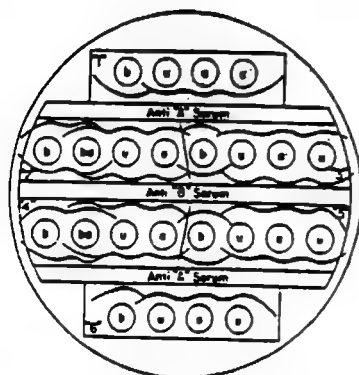


FIG. 2—Position and reaction sites (5 areas) each consisting of 4 antigen wells.

شكل (٢)

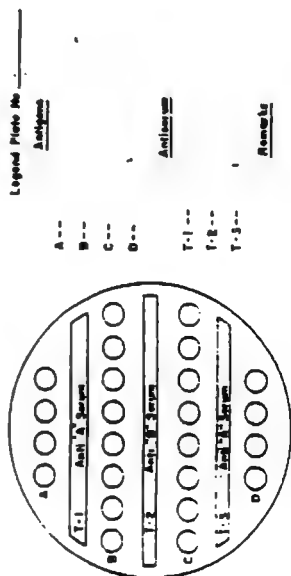


Plate No. _____

FIG. 3—Workshop showing well and trough arrangement and antigen-antiserum placement.

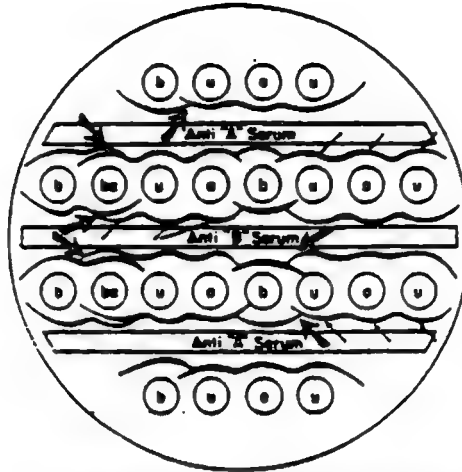


FIG. 3—Precipitin pattern resulting from heterologous antigen-antibody reactions: a, antigens derived from species A; b, antigens derived from species B; u, antigens derived from unknown; e, lines of partial identity; —, lines of identity.

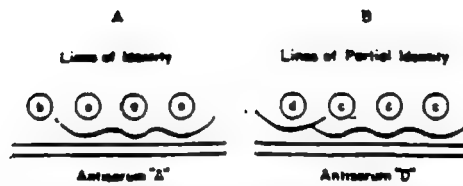


FIG. 4—Precipitin lines of identity and partial identity.

المراجع:

- (1) Ouchterlony, O., *Handbook of Immunodiffusion and Immuno-electrophoresis*, Ann Arbor, Mich., 1968.
- (2) *Manual of Microbiological Methods*, Society of American Bacteriologists Committee on Bacteriological Technique, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, 1957, p. 13.
- (3) Proom, H., *J. Pathol. Bacteriol.* 55, 419-426 (1943).

أوفيدين (بيتا - الانيل - ل - ٣ مثيل هيسيتيدين 'بالانين')

والهيسيتيدين ثنائى الببتيد فى لحوم الخنزير

**Ophidine (B-Alanyl-L-3- methylhistidine, 'Balentine'
and other Histidine Dipeptides in Pig Muscles and Tinned
Hams.**

**Patric R. Carnegie etal J. Sci. Food Agric, 1982, 33,
795-801.**

(أوفيدين (بيتا - الانيل - ل - ٣ مثيل هيسيتيدين 'بالانين')

والهيسيتيدين ثنائى البيتيد فى لحوم الخنزير

تقديم:

الهيسيتيدين يحتوى على ثنائيات البيتيدات، كارنوسين (بيتا - الانيل - ل - هيسيتيدين) وأنسرين (بيتا - الانيل - ل - ١ - مثيل هيسيتيدين) وأنسرين (بيتا - الانيل - ل - ١ - مثيل هيسيتيدين) معروف منذ زمن بعيد بوجوده فى أنسجة اللحوم. والهيسيتيدين الثلاثى يحتوى على ثنائى البيتيد، بيتا الانيل - ل - ٣ - مثيل هيسيتيدين موجود أيضاً فى لحوم الثعابين والحيتان والخنزير، حديثاً، اكتشفت كميات صغيرة من الأوفيدين فى لحوم الغنم وأثار من الأوفيدين فى لحوم الحيوانات الأخرى.

استخدام اختبار السريولوجى فى التعرف على أنواع لحوم الحيوانات من اللحوم الجاهزة لا تعطى نتيجة وذلك لفقد البروتين خواصه الطبيعية أثناء عملية الطبخ. العالمان تسبرج وسليوم يستخدمون ratio بين الانسرين (anserine) إلى الكارنوسين (carnosine) فى التعرف على لحوم الدجاج فى لحوم اللانشون. ويستخدم الأوفيدين ophidine فى التعرف على لحوم الخنزير المطهية وفى المقائق وفى Tinned hams. كما تستخدم النسب بين الانسرين: الكارنوسين: الأوفيدين فى التعرف على لحوم الخنزير فى المنتجات الغذائية المحتوية على لحوم خنزير.

وفى هذه الدراسة يستخدم الأوفيدين للتعرف على لحوم الخنزير باستخدام طريقة الكروماتوجراف، كما يستخدم الانسرين والأفيدين فى التعرف على لحوم الخنزير فى tinned hams.

طريقة العمل:

١- المواد Materials

- ل - نترات الانسرين
- ل - كارنوسين
- نيترو تيروسين
- مصلى الاليومين البقرى والافيدىن .
- لحوم الخنزير
- Tinned hams

٢- طريقة تحضير المستخلصات

١- تذبح الحيوانات وتؤخذ عينات اللحوم من الجانب الأيسر وتقطع إلى قطع صغيرة تزن كل منها ٢٠ جرام وتجمد فوراً فى نيتروجين سائل وتخزن عند درجة حرارة - ٢٠° س قبل التحليلات خلال أسبوعين .

والطريقة التى تستعمل مطورة من طريقة العالمان كوين وفيشر، وهى يوزن ٢ جرام من لحم الخنزير الأحمر من كل قطعة لحم مجمدة وتفرم فى محلول ملحي (٩ جرام كلوريد صوديوم فى اللتر (9 gm NaCl-liter-1; 2mlg-1 wet weight) مستخدماً خلاط Sorvall omni - mixer عند ٨٠٠٠ لفة فى الدقيقة لمدة دقيقة ولتجنيس ١٥٪ من ٥ - حمض سلفوساليسيلك (10 mlg-1 wet weight) يضاف إلى المخلوط ويخلط حتى يتجنس المخلوط ثم يدور فى جهاز الطرد المركزى عند ٦٠٠٠ لفة فى الدقيقة عند درجة حرارة ٥ س لمدة ساعة . يؤخذ الجزء الطافى ويرشح ثم يؤخذ ٥٠٠ ميكرو لتر من الراشح ويضاف إلى الحامض الأمينى analyser لتعيين الهستيدين المحتوى على ثنائى البيتيدات .

البروتينات المترسبة تغسل مرتين بواسطة ١٥ ٪ حمض السلفوساليسليك، والبروتين الخام الموجود فى أنسجة اللحم تعين بواسطة biuret reaction المطور وهذا مفيد فى الاستخدام لتعيين حتى البروتين غير الذائب. مصلى الأليومين البقرى يستخدم كقياس (as a standard)

٣- التحليل المائى (الحلماة) للبروتين الخام:

تعين ٣- مثيل هستيدين يوزن ٣ ملجم من البروتين الخام المحلماً خالى من الدهون فى ١,٠٠ ملل من ٦٦ م حمض الهيدروكلوريك لمدة ٢٢ ساعة عند درجة حرارة ١٠٥° س فى حوصلة (in vacuo) تجفف المادة المحلماة طول الليل تحت تجفيف مفرغ (vacuum desiccator) ثم يذاب فى ٦٠٠ ميكرو لتر من محلول ٠,٣٥ م سترات الصوديوم المحايد (اس هيدروجينى ٢,٢)، يوضع ٤٠٠ ميكرو لتر على الحامض الأمينى المحلل (analyser) لتعين مادة ٣- مثيل هستيدين.

٤- تغيير أيونات الكروماتوجراف Ion-exchange chromatography

تحليل الهستيدين المحتوى على ثنائى الببتيد، ٣ مثيل هستيدين المتحصل عليه من الحامض الأمينى المحلل (analyser). حالة التجربة للتحليل لثنائى الببتيدات هى: محلول محايد من سترات الصوديوم، ٠,٣٥ م فى الصوديوم (اس هيدروجينى ٥,٥٢)، ومعدل تدفق ٦٠ ملل فى الساعة، درجة حرارة العمود ٣٥ س لمدة ١٢٦ دقيقة الأول ثم ٥١° س لباقى التحليل وحجم العمود ٩, ٠ سم × ٢٩ سم (Locart LA/49/36) كاتيون لتغيير الراتنج (resin).

تركيز محلول ٣- مثيل هستيدين المحلل يقاس باستخدام نفس النظام ما عدا المحلولين المحايدتين المستخدمين: محلول محايد I (اس هيدروجينى ٢,٢، ٣٥° س، ١٣٥ دقيقة فى المحلول المحايد الثانى II (أس هيدروجينى

(٥,٥٢) ٥١°س. المحلولين المحايدين لهم نفس قوة الايون (Ione strenght) ٣٥,٠ م فى الصوديوم. بعد سريان كل عمود مجدد بواسطة ٢,٠ م هيدروكسيد الصوديوم لمدة ١٠ دقائق ويعادل المحلول المحايد المتوازن الاول عند درجة حرارة ٥٠°س. قمم الكروماتوجراف يتعرف عليها بالتطابق بواسطة مراجعة الأوقات. وأوضاع عينات القياس الداخلى الحقيقية إل-نيتروتيروسين، ٢٥ نانومتر فى ٥٠ ميكرو لتر (اس هيدروجينى ٢,٢) يضاف إلى كل عينة مباشرة قبل وضعه فى جهاز التحليل.

٥- تحليل رقائقي لحوم فخذ الخنزير (Linned hams)

لتقليل خطأ العينة من لحوم فخذ الخنزير، تجنس ٤٠ جرام من العينة بواسطة ٤٠ ملل من المحلول المحلى ثم يضاف ١٦٠ ملل من ٥- حمض السلفاسليسيك (٨٠ جرام/ لتر) تضاعف المستخلصات المصنعة من لحوم فخذ الخنزير يؤخذ ٤٠ جرام من اللحم الطارح من رجل الخنزير زنة ٧٠ - ٨٠ كيلو جرام والتي عوملت بنفس الطريقة provide comparison تؤخذ عينات (٥٠٠ ميكرو لتر) من المستخلصات ويحلل فيها هيستيدين ثنائى البيتيدات كما شرح سابقاً.

لتعيين المادة الجافة يؤخذ ١٠ جرام من العينة وتجفف فى فرن درجة حرارة ٨٥°س لمدة ١٨ ساعة ثم يكمل تجفيفها فى المجفف (desiccator).

النتائج والمناقشة:

١- مستخلص ثنائى البيتيدات المستخلص من اللحوم يقدر كمياً بالحامض الأمينى المحلل (analyser) مستخدماً المحلول المحايد من سترات الصوديوم (اس هيدروجينى ٥,٥٢) كما هو مبين فى الشكل (١)، كل مستخلص لثنائى البيتيد من اللحوم باستخدام محاليل محايدة منخفضة قيمة الأس الهيدروجينى،

أمونيا، ١ مثيل هيستدين، ٣- مثيل هيستدين المفصولة مع بعض (eluted together) فى الدقيقة.

الكروماتوجراف الأولى توصل المحاليل المحايدة المختلفة عند درجات حرارة مختلفة يشير إلى انخفاض الأس الهيدروجيني للمحاليل المحايدة نتيجة ضعف الفصل بين الهيستدين وثنائى البيتيدات وزيادة أوقات الفصل (elution). انخفاض درجة الحرارة يرفع من وقت الفصل (elution). بينما زيادة درجة الحرارة نتيجة تداخل للأحماض الأمينية وثنائى البيتيدات.

ولقد وجد العلماء أن فصل الهيستدين، ٣ مثيل هيستدين، ١- مثيل هيستدين حساسة جداً لأي تغير فى الأس الهيدروجيني (PH). وللحصول على أحسن نتائج يجب ثبات، وقوة الضغط للأس الهيدروجيني ودرجة حرارة المحلول المحايد. أقصى فصل للعمود من ٣- مثيل هيستدين ينجز باستخدام محلولين محايدين ودرجتين مختلفتين من الحرارة.

يوجد أقل من ٥٪ اختلافات بين تكرار التقديرات لهيستدين ثنائى البيتيدات فى نفس المستخلص. هذه الاختلافات بين محتويات البيتيد لنفس اللحم من الخنزير ونفس لحوم مولود الخنزير قليلة (جدول ١)، من هذا يتضح أنه لا يمكن تبقدير الأوفيدين بعد تحلل الرمى بواسطة الأنزيمات الموجودة فى لحوم الخنزير والمتركة لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٤° س ولا يوجد اختلافات جوهرية فى محتوى العينات للأوفيدين الموجودة فى النيتروجين السائل مباشرة بعد الذبح.

٢- هيستدين ثنائى البيتيدات فى لحوم الخنزير والأنسجة الأخرى تركيز الانسرين، الكارنوسين والأوفيدين تركيز الانسرين، الكارنوسين والأوفيدين وجد فى لحوم الخنزير عمر ٦ شهور (جدول ١) ولوحظ أن تركيز الأوفيدين

مرتفع فى لحوم العضلات. أعلى تركيز للأوفيدين يوجد فى عضلات Longissimus dorsi، semimembranosus للعضلات. عضلات القلب لا تحتوى على هيستيدين ثنائى الببتيدات وحدودية التقدير بهذه الطريقة محدود يصل إلى ٨,٠ ميكرومول للجرام بروتين. اللسان يحتوى على كمية قليلة من الأوفيدين وقد يرجع ذلك إلى محتوى البروتين الكثير فى non-myofibrillar كما فى الأنسجة الضامة.

ولم يظهر وجود هيستيدين فى عينة وزنها ٢ جرام من مخ الخنزير، المعدة، الأمعاء الدقيقة والطحال. ووجد الكارونوسين فى كبد وكلى لحوم خنزير عمر ٦ شهور يصل إلى ٤,٥، ١,٨ ميكرومول فى الجرام من البروتين بالتابع ولم يلاحظ وجود أنسرين أو أوفيدين. كما وجد كارونوسين فى بلازما الدم بتركيز ٣٨,٠ ميكرومول فى بلل ولم يلاحظ أنسرين أو أوفيدين.

٣- الأوفيدين فى الأنواع المختلفة من اللحوم: لحوم عظم فك الحوت يحتوى على تركيز عالى من الأوفيدين فى عضلة dorsi ويصل إلى < ٣٠٠ ميكرومول فى جرام البروتين بينما الحيوانات المنوية للحيتان تحتوى على < ١ ميكرومول فى جرام البروتين. كما وجد فى عينة عشوائية من لحوم الحيتان والدولفينات تحتوى على تركيز عالى وواضح أنه يصل إلى < ١٠٠ ميكرومول فى جرام البروتين. وتركيز الأوفيدين فى لحوم الشعابين يختلف تبعاً لأنواعها، شعابين البحار تحتوى على تركيز عالى يصل إلى ١٦٠ ميكرومول للجرام بروتين) عنها فى الشعابين الأرضية (يصل فيها من ١٠ - ٨٠ ميكرومول لجرام البروتين).

فُحصت ٦ أنواع من أسماك لصفيحة الخيشوم وجد الأوفيدين فى عضلة L.dorsi عند تركيز يتراوح من ٠,٦ - ٦,٢ ميكرومول للجرام البروتين،

والأوفيدين أيضاً موجود فى مستخلص لحوم التونة (bigeye & yellowfin) (١-٢ ميكرومول لجرام البروتين).

الأنواع الأخرى من الأسماك العظمية لم يلاحظ فيها الأوفيدين. كميات صغيرة من الأوفيدين لوحظت فى لحوم الأغنام والفصيلة البقرية (١-٣ ميكرومول لجرام البروتين). وبعض العلماء وجدوا بالكاد الأوفيدين فى لحوم الفئران والأرانب والإنسان (> ١٣, ٠ ميكرومول لجرام البروتين).

الدراسة الأولية لعينة ٢ جرام من لحوم البقر والأرانب والدجاج والكانجaro لا يوجد بها أوفيدين ولكن وجد الأوفيدين فى لحوم الأغنام (١ ميكرومول لجرام البروتين).

٤- تغيرات فى الهستيدين ثنائى الببتيدات مع العمر: معظم الأوفيدين فى أنواع لحوم الخنزير تزداد بالعمر (شكل ٢) عضلة L.dorsi يوجد بها زيادة عند I ميكرومول لجرام البروتين فى لحوم الولادات الحديثة من الخنازير وإلى ٧٢ ميكرومول بروتين تقريباً فى الخنازير التى عمرها ٨ سنوات. العلاقة بين ثنائى الببتيدات والانسرين والكارنوسين والأوفيدين فى عضلة L. dorsi من لحوم الخنزير كما هو مبين فى شكل (٣) بقايا الانسرين تظل ثابتة مع العمر تقريباً، بينما الكارنوسين يرتفع سريعاً فى خلال سنة الأولى من النمو ثم يثبت بعد ذلك، أما الأوفيدين الوحيد من ثنائى الببتيد يزداد بالعمر. كذلك لحوم الجهاز العظمى يوجد بها كما هو فى عضلة L.dorsi.

لا يوجد تغير ذات دلالة فى ٣-ميثل هستيدين الموجود فى بروتينات لحوم الخنزير فى أعمار مختلفة بين ٣ سنوات و ٨ سنوات. ومحتوى ٣-ميثل هستيدين فى عضلة L.dorsi هو 5.6 ± 0.1 s.e.m ميكرومول فى جرام

البروتين وفي عضلة *gastronemius* هو $5,7 \pm 0,1$ ميكرومول في جرام البروتين.

من النتائج الموجودة في شكل (٢) يرى معدل التجميع للأوفيدين في عضلة *L.drosi* للخنزير تقريباً ٢٥ نانومول في جرام البروتين في اليوم.

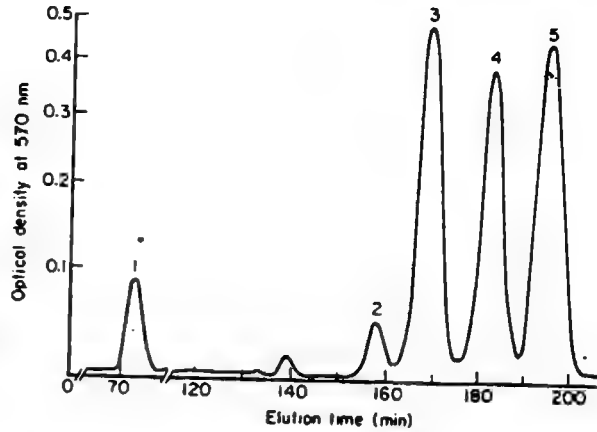
وجد العلماء عن حقن ٣-ميثل هستيدين فقط ٣٪ تخرج مع البول في اليوم والباقي يبقى في اللحوم على هيئة أوفيدين. على العكس في الفصيلة البقرية والإنسان والفئران والأرانب وجد أن ٣-ميثل هستيدين يخرج من أجسامهم بسرعة وهذا يدل على اختلاف طريقة خروج الأوفيدين خارج خلايا اللحوم المختلفة للخنزير.

٥- مقارنة لحوم فخذ الخنزير *Comparison of Rams* تحتوى لحوم فخذ الخنزير من الانسرين، كارنوسين والأوفيدين مبين في جدول (٢) وجد أن محتوى الأوفيدين هو نفس الموجود في عينة اللحوم الطازجة من رجل الخنزير عمر ٦ شهور.

نسبة محتوى لحوم *Tinned Leg* والكتف من الانسرين والأوفيدين مبين في شكل (٤).

الأوفيدين يمكن تقديره بسرعة كما أن نسبة الانسرين إلى كارنوسين في لحوم الخنزير تختلف عن أنواع اللحوم المختلفة كما هو مبين في رقم (٣) هستيدين ثنائي الببتيدات قد يفيد في التعرف على اللحوم المختلفة المصنعة وجوده منتجات لحوم الخنزير تعتمد على تحليل الهستيدين ثنائي الببتيدات.

Figure 1. Separation of histidine dipeptides from the *biceps femoris* muscle of an 8-year-old sow. Operating conditions are as described in section 2.4. 1. nitrotyrosine (73 min); 2. anserine (157 min); 3. carnosine (170 min); 4. ophidine (182 min); ad 5. ammonia, 1-methyl-L-histidine, 3-methyl-L-histidine (191 min).



شكل (١)

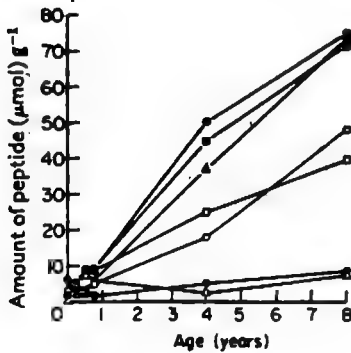
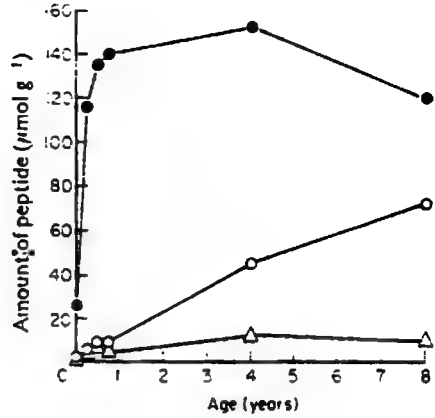


Figure 2. Effect of age on the ophidine content of pig muscles: ■, *longissimus dorsi*; ●, *semimembranosus*; ▲, *biceps femoris*; □, *gastrocnemius*; ○, *trapezius*; △, *masseter*; ◇, *tongue* muscle.

شكل (٢)

Figure 3. Effect of age on the content of histidine dipeptides in the *longissimus dorsi* muscle of the pig: —, anserine; ●, carnosine; and ○, ophidine.



شكل (٣)

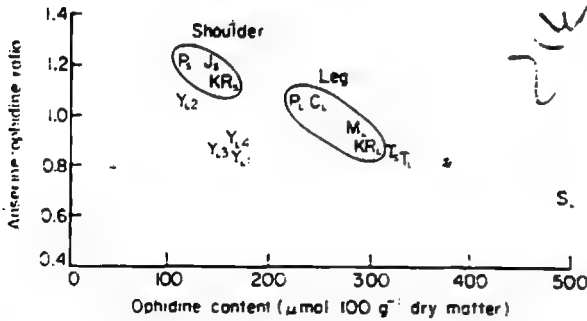


Figure 4. Ophidine content and anserine: ophidine ratio of shoulder (S) and leg (L) hams. The differences between the Yugoslavian shoulder and leg hams were significant at the 0.001 % level, as determined from a simple linear function estimated by ordinary least squares regression which explained 86 % of the variation in the ratio.

شكل (٤)

المراجع:

1. Bricas, E.; Fromageot, C. Naturally occurring peptides. *Adv. Protein Chem.* 1953, **8**, 1-125.
2. Crush, K. G. Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 1970, **34**, 3-30.
3. Suyama, M.; Suzuki, T.; Maruyama, M.; Saito, K. Determination of carnosine, anserine, and balenine in the muscle of animal. *Bull. Jpn Soc. Sci. Fish.* 1970, **36**, 1048-1053.
4. Imamura, H. Chemie der Schlangen. I. Über die N-haltigen Extraktivstoffe der Schlangemuskeln. *J. Biochem. (Tokyo)* 1939, **30**, 479-490.
5. Kendo, K. Über die Konstitution des Ophidins, eines N-haltigen Extraktivstoffes der Schlangemuskel. *J. Biochem. (Tokyo)* 1944, **36**, 265-276.
6. Tsunoo, S.; Horisaka, K.; Motonishi, K.; Takeda, J. Über das Ophidin in den Muskeln von den Sweeschlangen *Laticauda semifasciata* und *laticaudata*. *J. Biochem. (Tokyo)* 1964, **56**, 604-606.
7. Pocchiari, F.; Tentori, L.; Vivaldi, G. The presence of the dipeptide β -alanyl-3-methylhistidine in whale meat extract. *Scientific Reports of the Istituto Superiore di Sanità* 1962, **2**, 188-194.
8. Nakai, T.; Tsujigado, J.; Akiya, S. Extractives from muscle meat of *Balaenoptera physalus* (Linnaeus). *J. Biochem. (Tokyo)* 1963, **54**, 541-549.
9. Cocks, D. H.; Dennis, P. O.; Nelson, T. H. Isolation of 3-methyl

- histidine from whalemeat extract and the preparation of some derivatives. *Nature (London)* 1964, **202**, 184-185.
10. Dennis, P. O.; Lorkin, P. A., Isolation and synthesis of balenine, a dipeptide occurring in whale-meat extract. *J. Chem. Soc. (Lond.)* 1965, 4968-4972.
 11. Tsunoo, S.; Horisaka, K.; Tanabe, H.; Murata, M.; Takahashi, S.; Musashi, A.; Tanabe, J. Über die aus Verschiedenen-Delphinen-muskeln Isolierten β -alanyl - dipeptide und über ihre Pharmakologischen Wirkungen. *Jpn J. Pharmacol.* 1966, **16**, 98-109.
 12. Rangeley, W. R. D.; Lawrie, R.A. Methylamino acids as indices in meat products. I. The development and validity of an analytical procedure. *J. Food Technol.* 1976, **11**, 143-159.
 13. Rangeley, W. R. D.; Lawrie, R. A. Methylated amino acids as indices in meat products. II. Further examination of protein sources and the practical application of methylamino acid titres in predicting meat content. *J. Food Technol.* 1977, **12**, 9-26.
 14. Harriss, C. I.; Milne, G. The inadequacy of urinary J^T -methylhistidine excretion in the pig as a measure of muscle protein breakdown. *Br. J. Nutr.* 1981, **45**, 423-429.
 15. Harris, C. I.; Milne, G. The urinary excretion of N^T -methylhistidine - in sheep: an invalid index of muscle protein breakdown. *Br. J. Nutr.* 1981, **45**, 423-429.
 16. Harris, C. I.; Milne, G. The occurrence of the N^T -methylhistidine - containing dipeptide, balenine, in muscle extracts of various mammals. *Biochem. Soc. Trans.* 1980, **8**, 552.

17. Nakai, T.; Tsujigado, N. β -Alanyl dipeptide preparations from whale muscccles made by several workers. *J. Biochem. (Tokyo)* 1965, 57, 812-814.
18. Wolff, J.; Horisaka, K.; Fales, H. M. On the structure of ophidine. *Biochemistry* 1968, 7, 2455-2457.
19. Suyama. M.; Maruyama, M. Identification of methylated β -alanylhistidine in the muscles of snake and dolphin. *J. Biochem. (Tokyo)* 1969, 66, 405-407.
20. Tinbergen, B.J.; Slump, P. The detection of chicken meat in meat products by means of the anserine/carnosine ratio. *Z. Lebensm-Unters-Forsch.* 1976, 161, 7-11.
21. Quinn, M. R.; Fisher, H. Effect of dietary histidine on olfaction, and rat brain and muscle concentration of histidine - containing dipetides. *J. Neurochem.* 1977, 29, 717-728..
22. Haverberg, L. N; Omstedt, P. T.; Munro, H. N.; Young, V. R. N^T -methylhistidine content of mixed proteins in various rat tissues. *Biochim. biophys. Acta* 1975, 405, 67-71.
23. Goshev, I.; Nedkov, P. Extending the range of application of the biuret reaction: quantitative determination of insoluble proteins. *Anal. Biochem.* 1979, 95, 340-343.
24. Zarkadas, C. G. A simple chromatographic method for the determination of the methylated basic amino acids in proteins. *Can. J. Biochem.* 1975, 53, 96-101.
25. Harris, C. I.; Milne, G. The urinary excretion of N^T -methylhistidine by cattle: validation as an index of muscle protein breakdown. *Br. J. Nutr.* 1981, 45, 411-422.

26. Long, C. L.; Haverberg, L. N.; Young, V. R.; Kinney, J. M.; Munro H. N.; Geiger, J. W. Metabolism of 3-methylhistidine in man. *Metab. Clin. Exp.* 1975, 24, 929-935.
27. Young, V. R.; Alexis, S. D.; Baliga, B. S.; Munro, H. N; Muecke, W. Metabolism of administered 3-methyl- histidine. Lack of muscle transfer ribonucleic acid charging and quantitative excretion as 3-methylhistidine and its N-acetyl derivative. *J. Biol. Chem* 1972, 247, 3592-3600.
28. Harris, C. I.; Milne, G.; Lobley, G. E.; Nicholas, G. A. 3-Methylhistidine as a measure of skeletal-muscle protein catabolism in the adult New Zealand white rabbit. *Biochem. Soc. Trans.* 1977, 5, 706-708.

**الكشف عن الخواص الجزيئية لبروتينات
لحوم الخنزير بالمجرة الكهربائية للمناعة فى الأجاروجيل**

**Detection and partial characterization of soluble pig
muscle proteins by immunoelectrophoresis in agaros gels.**

**C. Casas, J. Tormo, P. E. Hernandez and B. Sanz J. of
food Technology, 1984, 19, 283-287.**

الكشف عن الخواص الجزيئية لبروتينات لحوم الخنزير بالهجرة الكهربائية للمناعة في الأجاروزجيل

أساس الطريقة:

تلوث منتجات اللحوم المفرومة والمحتوية على خضروات (& parsons Lowire 1972) أو بروتينات حيوانية (Deschreider & Meaux, 1974) لم يتضح تركيباتها في هذه المنتجات، الاختبار السريع البسيط يستعمل قدر الإمكان لتعيين الإضافات غير المعلومة من اللحوم في المنتج والتي تعطى المستهلك حماية أكبر.

● مناعياً، يمكن بها تمييز بروتينات الحيوانات المختلفة مستخدماً الأمصال المضادة لبروتينات اللحوم أو لمصل الدم (warnecke & saffle, 1968).

● المجهودات لتعيين حزمة البروتينات الخاصة للبروتينات الذائبة من لحوم الخنزير، والخالية من التداخل التفاعلي مع البروتينات الذائبة من لحوم البقر، الخيل، والدجاج بطريقة الهجرة الكهربائية للمناعة في الأجاروزجيل.

حزمة البروتينات الخاصة تظهر وجود لحوم الخنزير في منتجات اللحوم في أول وقت للهجرة الكهربائية للمناعة بمضادات (البروتينات الذائبة).

المواد والطرق المستخدمة:

تحضير مستخلصات الانتيجين

يوزن ٢٥٠ جرام من عضلات الخنزير (Ms. intercostalis externi and Ms. trapezius) ومن عضلات الخيل (Ms. glutaeus superficialis and Ms. biceps femoris) ومن عضلات البقر (Ms. rectus femoris, MS. vastus lat-)

(*Ms. pectoralis* and *Ms. supracoracoideus*) ومن عضلات الدجاج (eralis) تسحق وتفرم وتجنس وتوضع في ٥٠٠ ملل من محلول ملحي ٠,٨٥ ٪ . البروتين الذائب يستخلص بثبات التحريك والتجنيس لمدة ساعة عند درجة حرارة ١°س. مستخلصات البروتين ترشيع من خلال ورق ترشيع وات مان رقم ١ ، ويجفف بالتجميد والمستخلصات الجافة توضع في صناديق مقفلة جيداً وتحفظ عند درجة حرارة - ٢٠°س حتى الاستخدام.

تحضير الأمصال المضادة

مصل يحتوي على أجسام مضادة لأمصال بروتينات الخنزير (PSP) والمتحصل عليها بحقن ذكر أرنب النيوريلاندى تحت الجلد بجرعات منفردة من مستخلصات بروتين الخنزير الجاف بالتجميد (٤٨ ملم) في ٢ ملل من ماء مقطر متأين emulsified في ٠,٥ ملل من مذيب Freund. ١٥ جرعة booster تعطى تحت الجلد كل ٤ أيام لمدة ٦٢ يوم. تتزف الأرانب من حين لآخر من الوريد الأذنى ويترك الدم يتجلط عند درجة حرارة الغرفة ثم يبرد عند درجة حرارة ٤°س لمدة ١٨ ساعة. مضادات الأمصال تصب وتدور في جهاز الطرد المركزي عند ١٠٠٠ لفة في الدقيقة لمدة ١٠ دقائق لإزالة بقايا الخلايا الدموية الموجودة.

تحضير الأجاروزجيل:

أساس طريقة التحضير جربر، ويليام ١٩٥٣ والمعدلة بواسطة شدرجر ١٩٥٥.

- ١٪ أجاروزجيل في محلول محايد من الفيرونال (مادة منومة)، أس هيدروجيني ٨,٦.

- يخرم الجليل بواسطة قاطع الحفر إلى حفر قطرها ١ مم، شريط ٢, ٠ × ٢ سم.
- يوضع ١ ميكرو لتر (٢٤ ميكروجرام) من مستخلص الانتيجين فى الحفر.
- الشرائط توضع فى جهاز الهجرة الكهربائية (electrophoresis) لمدة ٤ ساعات عند ١٣٠ فولت.
- تملأ الشرائط المعدنية بواسطة ٣, ٠ ملل من الأمصال المضادة المقابلة.
- ينجز الانتشار المناعى من ١٨ - ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣٧° س.
- شرائط البروتين المترسبة ترى بواسطة الأמיד الأسود (مركب ناتج عن إذلال مجموعة حامض عضوى محل ذرة الهيدروجين فى جزئ النشادر) (clausen, 1981)
- الخواص الجزيئية للكيمياء المناعية لهذه الشرائط تشمل فى الكشف عن جزيئات الجليكوبروتين تبعاً لطريقة نادى (NADI'S) (Clousen, 1981) وجزيئات الليبوبروتين بالسودان الأسود (sudan black) (uriel Avrameas & Grabar, 1963)
- درجة الإراحة نسبياً لكل شريط لمصل الأليومين البقرى يستخدم كمعيار (كمقياس) وتعين كالتالى:

$$\frac{\text{إراحة للشريط (مم)}}{\text{حجم / مم / ثانية}} = \text{الانتقال المطلق}$$

$$\text{absolute mobility} = \frac{\text{band displacement (mm)}}{\text{v/mm/sec}}$$

الفصل الثالث: الكشف عن لحوم الخنزير ومتجاته فى المنتجات الغذائية

$$\frac{\text{إزاحة الشريط (مم)}}{\text{إزاحة مصّل الألبومين البقرى (مم)}} = \text{الانتقال النسبى}$$

$$\text{absolute mobility} = \frac{\text{band displacement (mm)}}{\text{bovine serum albumin displacement (mm)}}$$

$$\% \text{ الانتقال} = \text{الانتقال النسبى} \times 100$$

$$\% \text{ mobility} = \text{relative mobility} \times 100$$

النتائج ومناقشتها:

• الكشف عن حزمة البروتين الذائب من بروتينات الخنزير، التفاعلات التداخلية الحرة ببروتينات الخيل الذائبة، ومستخلصات البروتينات الذائبة والمجففة بالتجميد لكل من البقر والدجاج التى يتم تحليلها بواسطة جهاز الهجرة الكهربائية للمناعة (Immuno electrophoresis) فى الأجارورجيل ضد الأمصال المضادة لبروتينات الخنزير الذائبة المتتجة من الأرانب.

• مستخلصات البروتين الذائبة للحوم الخنزير والمجففة بالتجميد يعمل لها تحليل ضد مضادات الأمصال المتجنسة allowed والمستخدم فى تقدير النسب المثوية لإزاحات ٦ أنواع من حزم البروتين المترسبة وهى بين ± 16 ، ٠.٠٤ ، $75 \pm 1,70$ (جدول ١ وشكل ١) ثلاثة حزم من الست حزم wer arbitrarily defined as major bands ترجمة (شرائح ١ ، ٤ ، ٦) بالصبغة القوية للأميدو الأسود (Amido black). أما الثلاثة الباقون من الشرائط (شريط ٢ ، ٣ ، ٥) والمعروفة كشرائط صغيرة لضعف صبغتها بنفس الصبغة السابق ذكرها.

الخواص الجزئية للمناعة الكيميائية (جدول ٢) للشرائح يتعرف عليها

بوجود أجزاء من الجليكوبروتين والليوبروتين فى تركيباتها الناتجة فى شريط واحد فقط من الجليكوبروتين (شريحة ٥).

عند تحليل مستخلصات بروتينات لحوم الخيل والمجففة بالتجميد ضد الأمصال المضادة لمصل بروتين لحوم الخنزير، لوحظ وجود ٤ شرائط من البروتينات المترسبة لها نسبة مئوية من الإزاحات $16 \pm 10, 0, 17 \pm 34, 0, 33 \pm 43, 1, 37 \pm 99, 0$ (شكل ١). أثناء تحليل مستخلصات بروتينات لحوم الدواجن ضد نفس المصل المضاد لمصل بروتين لحوم الخنزير، وجد نسبة الإزاحة المثوية لثلاثة شرائط هي $16 \pm 18, 0, 33 \pm 74, 0, 48 \pm 02, 1$. أثناء تحليل مستخلصات بروتينات لحوم البقر ضد المصل المضاد لمصل بروتين الخنزير وجد النسبة المثوية للإزاحة لاثنتين من الشرائط هي $17 \pm 42, 1, 37 \pm 87, 0$. كل هذه الشرائط إزاحتها تقفل عن شرائط ١، ٢، ٣، ٤، ٥ للبروتينات الذائبة من لحوم الخنزير ضد المصل المضاد لمضادات البروتينات الذائبة للحوم الخنزير، استجابتهم قد تكون للتفاعلات الإيجابية المضللة حين محاولة التحليل الكمي لمختلف المستخلصات المختلفة لبروتينات الحيوانات بواسطة الانتشار المناعى (Gabucci & Flego, 1975). وأنها أيضاً مهمة للتأكد بأن معظم شريط ٦ للبروتينات الذائبة للحوم الخنزير مضادة ضد المصل المضاد لمصل بروتين الخنزير، خاصة شريط بروتين الخنزير المترسب لا يظهر عندما تكون مستخلصات بروتين اللحوم للخيول، البقر، الدجاج عند تحليلها ضد نفس المصل المضاد لمصل بروتين الخنزير.

هذه خاصية شريط بروتينات الخنزير هذه قد تدل على وجود لحوم الخنزير فى المنتجات، عندما تكون مستخلصات البروتينات الذائبة تحلل ضد المصل المضاد لمصل بروتين الخنزير، نظرياً، هذا البروتين لا بد من وجوده فى أى نوع مذاب ومتجانس فى بروتين لحوم الخنزير مهما كانت تركيب الخليط.

● استخدام جهاز الهجرة الكهربية للمناعة (Immunoelectrophoresis) في الأجاروزجيل للتفريق بين البروتينات المختلفة من الحيوانات المختلفة باستخدام الأمصال المضادة ضد أمصال البروتينات كمرجع يحتذى به (karpas, Myer & Segre, 1970) هذا يدل على استخدام الأمصال المضادة للبروتينات الذاتية مكان مضادات الأمصال ضد مصل البروتين قد يبرهن على هذا العمل ويرجع إلى صرامة تحليل بروتينات اللحوم الذاتية ضد البروتينات غير الذاتية. بروتينات اللحوم الذاتية ضد مصل بروتينات الدم. واقعية استخدام هذا التكنيك عندما يطبق على خليط من اللحوم المركبة الموجودة في اللحوم المخلوطة (مثل البيض، اللبن، بروتينات الخضروات لم تؤكد صحتها إلى الآن).

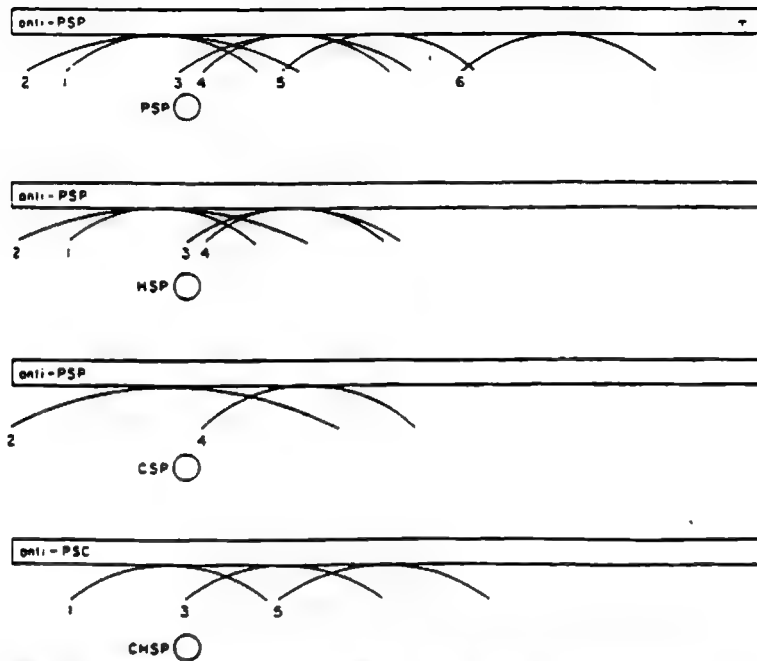


Figure 1. Patterns of protein precipitin bands of different animal soluble muscle proteins against a soluble pig muscle protein antiserum (anti-PSP). PSP, pig proteins; HSP, horse proteins; CSP, cow proteins; CHSP, chicken proteins.

شكل (١)

Table 1. Absolute, relative and percent mobilities of protein precipitin bands of soluble pig muscle proteins (PSP) against a rabbit homologous antiserum (anti-PSP)*

Precipitin band (No.)	Band displacement (mm)	Absolute mobility	Relative mobility	Percent mobility
1	6.0	0.69±0.06	0.16	16±0.04
2	6.5	0.75±0.06	0.17	17±1.03
3	12.5	1.44±0.22	0.33	33±1.32
4	14.0	1.62±0.17	0.37	37±1.09
5	18.0	2.08±0.20	0.48	48±0.66
6	28.0	3.24±0.38	0.75	75±1.70
B. albumin	37.0	4.28±0.34	1.0	100
Dextrane	0.0	0.0	0.0	0.0

*The degree of displacement of each band relative to bovine serum albumin used as standard, was defined as stated in Materials and methods.

جدول (١)

Table 2. Detection and immunochemical characterization of protein precipitin bands of pig soluble muscle proteins (PSP) against a rabbit homologous antiserum (anti-PSP)

Immunization period		Precipitin bands (band No.)		Immunochemical characterization (band No.)	
Bleeding	Days	Major	Minor	Glycoproteins	Lipoproteins
B1	12	1	—	—	—
B2	28	1,4,6	—	—	—
B3	48	1,4,6	2,3,5	5	—
B4	62	1,4,6	2,3,5	5	—

جدول (٢)

المراجع:

- Clausen, J. (1981). In *Immunochemical Techemical Techniques for the Identification and Estiimation of Macromolecules*. (Ed. by T. S. Work & E. Work). Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Deschreider, A. R. & Meaux, R. (1974). *Industries Alimentaires et Agricoles*, **91**, 101-106.
- Gabucci, G. & Flego, L. (1975). *Bolletino dei Chimici dei Laboratori Provinciali di Trieste (Italia)*, **7**, 236-240.
- Grabar, P. & Williams, C. A. (1953). *Biochimica Biophysica Acta*, **10**, 193-202.
- Karpas, A. B., Myers, M. L. & Segre, D. (1970) *Jurnal of Food Science*, **35**, 150-155.
- Parsons, A. L. & Lawrie, R. A. (1972). *Journal of Food Technology*, **7**, 455-462.
- Scheidegger, J. J. (1955). *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, **7**, 103-110.
- Uriel. J., Avrameas, G & Grabar, P. (1963). In: *Protides of the Biological Fluids*. (Ed. by J. Peeters). Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Warnecke, M.O. & Saffle, R. L. (1968). *Journal of Food Science*, **33**, 131-135.

التعرف على اللحوم فى المنتجات الغذائية

Technical note: The identification of Meat in food products.

I. HIBBERT and R. A. LAWRIE.

J. Fd Technol, 7, 333-33, 1972.

التعرف على اللحوم فى المنتجات الغذائية

تعيين محتويات اللحوم فى المنتجات الغذائية بعد تجهيزها، الطريقة تعتمد على جهاز جيل الهجرة الكهربائية gel electrophoresis للتعرف على كمية أنواع اللحوم المختلطة بعد معاملتها حراريا إلى ١٢٠° س لمدة ٣ - ٦ دقائق (Mattey, parsons & Lawrie, 1970)، هذه الطريقة تحقق من تغير طبيعة البروتين الأصلية وتركيزها فى المنتجات التى تعرضت للحرارة مدة طويلة أثناء التجهيز (parsons & Lawie, 1972) حينما يكون التعرض شديد وكافى، تكسير البروتينات هى مفتاح التعرف بأى طريقة. إذا وجد بعض مكونات Myofibrillar proteins وهى خاصية مركب اللحوم الوحيدة للتعرف عليها وخصائصها الكيميائية غير مصقولة.

الأبحاث الحديثة تشاهد ٣- مثيل هستيدين (3-methylhistidine) هو من المحتوى الطبيعى للتفاعل والميوسين فى عضلات الحيوانات الكبيرة Johnson et al 1967، Johnson & perry 1970. إذا كان الحمض الأميني Amino acid غائب من البروتينات غير الحيوانية المصدر كما هو موجود فى المواد الغذائية طريقة Johnson et al 1967 لتعيين ٣- مثيل هستيدين فى Myofibrillar protein المعزول من العضلات التى تطبق مع بعض التطوير البسيط لها إلى التحليل المائى (الحلماة) لعناصر اللحوم التى قد تستخدم فى منتجات اللحوم وخليط لحوم الأبقار وفول الصويا.

يوضع من ١ - ١,٥ جرام فى ٢٠٠ ملل حمض الهيدروكلوريك لمدة ٢٤ ساعة وهذه الطريقة لا تكسر ٣- مثيل هستيدين عند إضافة التحليل المائى (الحلماة) تبرد ثم ترشح من خلال ورق ترشيح وات مان نمرة ٤٢ ويخفف إلى ٢٥٠ ملل وذلك لمحتواه المنخفض من ٣- مثيل هستيدين فى المواد المدروسة

وجد أنه من الضروري تركيز حتى ٧٥ ملل من الحلمات فى مجفف دوار وذلك لكل عزله كروماتوجراف واحدة.

وفى النهاية يوضع فى عمود 30×0.6 , للتكنكون كروميد (Technicon chromobeads) ويستخدم عند درجة حرارة 30° س ويجمع ٨, ٠ ملل من Fractions بواسطة جهاز LKB المطور مع عمل ضغط من الهواء أو النيتروجين ٢٥ psi معدل الانسياب ١٥ ملل/ الساعة. تحت هذه الظروف ٣- مثيل هستيدين يظهر واضح المعالم عند القمة الهستيدين فى ca.100ml ولإظهار اللون يوضع نين هيدرين (Ninhydrin). إجمالى النيتروجين يعين بواسطة ماكروديجستين وميكروديستلات macrodigestion & microdistillation محتوى عينات اللحوم من الأبقار والأغنام والخنازير من ٣- مثيل هستيدين كانت ٥-٦ ملجم/ جم من إجمالى النيتروجين. هذه القيمة هى نفس المطلوب المحسوبة رياضياً على قاعدة المحتوى المعزول Myofibrillar protein من ٣- مثيل هستيدين وتركيز المحتوى المعزول من Myofibrillar protein فى بروتينات القمح، وفول الصويا والكازين والجيلاتين لا تكتشف حتى لو استخدم تركيز ٢٠ مرة من الحلمات المستعملة مع اللحوم.

حينما تطبق الطريقة لمخالط اللحوم البقرية وفول الصويا والثى تعباً فى علب معقمة، يوجد علاقة مقنعة بين العيار الحجمى ٣-مثيل هستيدين ونسبة اللحوم فى المخلوط (جدول ١).

تعين تركيز ٣ مثيل هستيدين كملجم/ جم مجموع N فى عينة مجهولة سويًا مع معلومات عن مجموع N فى اللحوم (Anon, 1961, 1963) يسمح بظهور حساب النسبة المثوية للمحتوى وذلك لوجود اللحوم.

الطريقة يمكن استخدامها بوضوح حتى مع الحلمات (التحلل المائى) للمتجات.

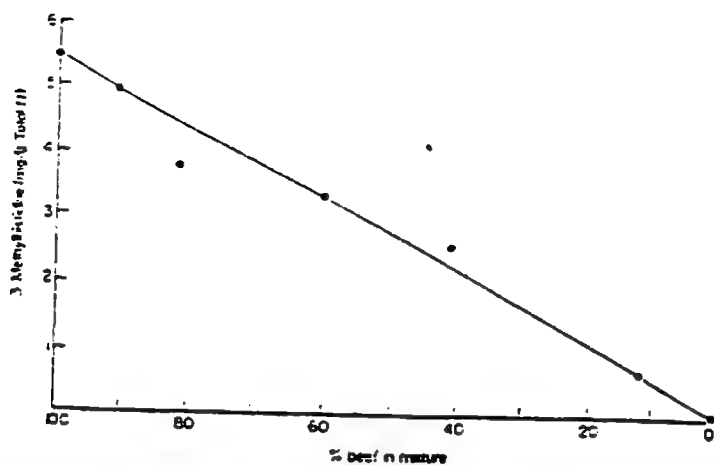


Fig. 1. Relationship between percentage of beef and 3-methylhistidine titre (as mg/g total nitrogen) in mixtures with texturized soya protein after subjection to canning under conditions required for commercial sterility.

شکل (۱)

المراجع:

- ANON, (1961) *Analyst, Lond.* 86, 557.
- ANON, (1961) *Analyst, Lond.* 88, 422.
- JOHNSON, P., HARRIS, C.I. & PERRY, S.V. (1967) *Biochem. J.* 105, 361.
- JOHNSON, P. PERRY, S.V. (1970) *Biochem. J.* 119, 293.
- MATTEY, M., PARSONS, A.L. & LAWRIE, R.A. (1970) *J. Fd Technol.* 5, 41.
- PARSONS, A.L. & LAWRIE, R.A. (1972) *J. Fd Technol.* (In press).

الفصل الرابع

الكشف عن دهون الخنزير

في المنتجات الغذائية

الفصل الرابع

الكشف عن دهون الخنزير فى المنتجات الغذائية

أساس الطريقة :

التركيب الكيميائى لدهن الخنزير ودهون الحيوانات الأخرى متشابه جداً ولتحديد دهن الخنزير فى الدهون الأخرى والمنتجات الغذائية يكون فى متهى الصعوبة إذ كانت كميته صغيرة جداً ولذلك يتطلب طريقة حساسة لهذا الغرض .

وتعتمد الطريقة على اختلاف أنتشار حمض البالتيك فى الموضع ، للجليسريدات الثلاثية فى دهن الخنزير والدهون الأخرى للحيوانات والخضروات ويحتوى دهن الخنزير على أكبر كمية من حمض البالتيك وتقدر بأربعة أضعاف تقريباً عنه فى الدهون الأخرى .

ويمكن بهذه الطريقة تقدير دهن الخنزير عند ٥ ٪ فأكثر عند خلطه بدهون الحيوانات الأخرى مثل دهن البقر والغنم والزبد وهذه التجربة تطبق على الزيوت والدهون التى يكون لها نقطة انصهار أقل من ٤٥ °س بسبب الخصوصية لمفعول إنزيم البنكرياتيك لبياز .

وهذه التجربة لا تنطبق على الزيوت والدهون المحتوية على أحماض دهنية غير مشبعة بكمية عالية (بأكثر من أربعة أضعاف الروابط) وتحتوى على ٢٠ ذرة كربون أو أكثر (زيوت السمك والحيوانات البحرية) أو الأحماض الدهنية التى تحتوى على مجموعات أكسجين عنها فى مجموعات الأحماض والمنتجات التى تحتوى على دهن الخنزير المطور (المعدل) وتحتوى الطريقة على الخطوات التالية :

- ١ - استخلاص الدهن من المنتجات الغذائية .
- ٢ - تنقية الجليسيريدات الثلاثية بعمود الكروماتوجراف .
- ٣ - تحضير ٢ - الجليسيريدات الأحادية من الجليسيريدات الثلاثية بالتحليل المائي بإنزيم بنكرياتيك ليباز .
- ٤ - فصل ٢ - الجليسيريدات الأحادية بجهاز الكروماتوجراف ذو الطبقة الرقيقة .
- ٥ - تصبين وتأمثر الجليسيريدات الثلاثية ، ٢ - الجليسيريدات الأحادية .
- ٦ - فصل وتقدير استرات المثيل للأحماض الدهنية بواسطة جهاز الكروماتوجراف السائل الغازي .
- ٧ - حساب الصورة الجانبية للحمض الدهني ، حمض البالميتيك .

الكواشف :

- ١ - إيثانول ٩٥ ٪ جم / جم
هكسان أو بترولين خفيف (٣٠ - ٦٠ °س)
- ٢ - بروبانول ٥٠ ٪ (حجم/ حجم) أو إيثانول ٥٠ ٪ (حجم/ حجم) محلول هيدروكسيد صوديوم ٠,٥ عياري .
- محلول فينول فيثالين ١ جرام/ ١٠٠ مليلتر سائل في ٩٥ ٪ إيثانول جم/ جم
- اليومينا طبيعية نشطة لجهاز الكروماتوجراف
- بركامات نشط ١ ، ينشط حديثاً لمدة ساعتين عند ٢٦٠ °س ويترك في

مجفف .

- ميثانول
- ثنائي إيثيل ايثر بيروكسيد
- كبريتات الصوديوم اللامائية
- سائل حمض الهيدروكلوريك ٦ عياري
- محلول شولات الصوديوم ١ جرام/لتر محلول مائي
- محلول كلوريد الكالسيوم ٢٢٠ جرام/لتر
- محلول محايد ١ إم محلول مائي من ثلاثي هيدروكسي ميثيل أمينو ميثان عند ١ س هيدروجيني ٨ مع حمض الهيدروكلوريك ٦ عياري
- كمية مناسبة من إنزيم بنكرياتيك ليباز
- أميتون
- شرائح سليكا جيل ٦٠ لجهاز الكروماتوجراف ذو الطبقة الرقيقة .
- مذيب مظهر يحضر كما يلي :
- ان (n) - هكسان أو بتروليم الخفيف (٣٠ - ٦٠ °س) ٧٠ مليلتر
- ثنائي اثيل ايثر ٣٠ مليلتر
- حمض الفورميك ٩٨ ٪ (حجم/حجم) ١ مليلتر
- محلول ٧,٢ ثنائي كلوروفلورسسين يستخدم ككشاف ٢ حم/لتر في ٩٥ ٪ (حم/حم) إيثانول ويضاف هيدروكسيد صوديوم ١ عياري/ ١٠٠ مليلتر من المحلول حتى يكون قلوياً هيدروكسيد صوديوم ، محلول ميثنوليك

- ٥, ٠ عيارى يذاب فى ٢ جرام هيدروكسيد صوديوم فى ١٠٠ مليلتر ميثانول لا يحتوى على أكثر من ٥, ٠ ٪ (مليلتر/مليلتر) من الماء .
- ثلاثى فلوريد البورون ، محلول ميثانوليك (٢٠ ٪ مليلتر/مليلتر)
- هيتان لتدريج الكروماتوجراف .
- محلول مائى مشبع من كلوريد الصوديوم .
- أحمر الميثايل ١ جرام/لتر محلول فى ٦٠ ٪ إيثنول (جم/جم) .
- خليط من استرات الميثيل من الأحماض الدهنية أو استرات الميثيل من الزيوت المعروف تركيبها .

لاتجهزة والادوات :

- ١ - خلاط كهربائى .
- ٢ - عمود راجى لجهاز الكروماتوجراف قطره الداخلى ١٢ مليلتر وطوله ٤٠٠ مليلتر .
- ٣ - جهاز تبخير للمياه .
- ٤ - قمع فصل سعته ٥٠ مليلتر .
- ٥ - قوارير مخروطية سعة ٢٥٠ ، ٥٠٠ مليلتر .
- ٦ - أقماع .
- ٧ - ورق ترشيح .
- ٨ - قوارير ذات قاع مستدير سعة ٥٠ ، ١٠٠ مليلتر .
- ٩ - جهاز طرد مركزى .
- ١٠ - أنابيب جهاز طرد مركزى سعة ١٠ مليلتر .

- ١١- حمام مائى مزود بترمو متر أتوماتيكي القراءة حتى درجة $40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
- ١٢- هزاز كهربائى .
- ١٣- ساعة إيقاف .
- ١٤- محقن أو ماصات باستير مثبت فيها حلمة جلدية .
- ١٥- شرائح زجاجية لجهاز الكروماتوجراف ذو الطبقة الرقيقة 20×20 سم .
- ١٦- حامل للشرائح .
- ١٧- وعاء زجاجى كبير .
- ١٨- محقن تحت الجلد (محقن الزرق) سعتها ١ مليلتر مزودة بإبرة رفيعة أو بأنبوبة شعرية .
- ١٩- لمبة أشعة فوق البنفسجية لفحص شرائح جهاز كروماتوجراف الطبقة الرقيقة .
- ٢٠- ملوق (ملعقة أو سكين) صغير .
- ٢١- فرن ذات درجة حرارة $153^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$ سم .
- ٢٢- مجفف .
- ٢٣- مكثف عاكس ٢٠ - ٣٠ سم كمثبت به قارورة ذت قاع مستدير .
- ٢٤- كرات صغيرة من الزجاج .
- ٢٥- غطاء حرارى .
- ٢٦- ماصات مدرجة مختلفة الأحجام مثبت بها حلقات جلدية .
- ٢٧- أنابيب اختبار مختلفة الأحجام .
- ٢٨- ميكرومحاقن .
- ٢٩- جهاز الكروماتوجراف الغازى .
- ٣٠- ثلاثة .

طريقة العمل :

تحضير عينة الاختبار :

استخلاص الدهن :

يوزن من ١٠ - ٥٠ جرام من العينة وتوضع على ١٠٠ مليلتر من الميثانول في الخلاط وتخلط جيداً لمدة دقيقتين ثم يضاف ٥٠ مليلتر هكسان أو بتروليم ايثر (٣٠ - ٦٠ س) و ٥٠ مليلتر ثنائي إيثيل ايثر ثم يخلط جيداً لمدة ٥ دقائق . ثم ينقل المستخلص دخل قمع الفصل . بقايا المستخلص يوضع عليها ٥٠ مليلتر من خليط الهكسات وثنائي إيثيل ايثر (١ : ١) تكرر ثلاث مرات ثم يوضع المستخلص في قمع الفصل .

يضاف ماء مقطر إلى قمع الفصل ويرج بلطف ثم ينتظر حتى تتكون طبقتين واضحتين تنقل الطبقة الموجودة بالقاع وتغسل الطبقة العليا ثلاث مرات بالماء المقطر ثم ينقل المستخلص في قارورة مخروطية سعة ٥٠٠ مليلتر ثم يضاف كبريتات الصوديوم اللامائية رج جيداً ثم تترك القارورة ١٠ دقائق ثم يرشح وينقل المذيب من الراشح باستعمال جهاز التبخير تحت ضغط منخفض عند درجة حرارة ٤٠ س . المستخلص يستعمل في تحليلات عديدة .

ملحوظة : إذا كانت العينة زيت أو دهن لا تحتاج إلى استخلاص ومباشرة تستخدم كما هو في خطوة رقم ٢ .

٢ - تعيين حموضة العينة :

تعيين حموضة عينة الاختبار تبعاً للمواصفة السعودية رقم ٣٠ عام ١٣٩٧ هـ . إذا كانت الحامضية أقل من ٣ ٪ تنقى العينة كما في الخطوة القادمة رقم ٤ . إذا كانت الحموضة أعلى من ٣ ٪ أولاً تعادل العينة بهيدروكسيد الصوديوم

فى وجود المذيب كما هو فى الخطوة رقم ٣ ثم تنقى من خلال اليومينا كما هو فى الخطوة رقم ٤ .

٣ - يعادل بهيدروكسيد الصوديوم :

يذاب حوالى ١٠ جرام من عينة الاختبار كما فى الخطوة رقم ١ فى ١٠٠ مليلتر من الهكسان أو البتروليم الخفيف ثم ينقل المحلول إلى قمع الفصل . يضاف ٥٠ مليلتر من الإيثانول ٩٥ ٪ حجم/حجم ، وقليل من النفط لمحلول فينوفثالين وحجم هيدروكسيد الصوديوم يكافئ الحامض الحر من الدهن أو الزيت بزيادة عن ٠,٥ ٪ . يرج جيداً لمدة دقيقة واحدة ويضاف ٥٠ مليلتر ماء مقطر ثم يرج مرة أخرى واترك المحلول حتى يتكون طبقتين واضحتين . تنقل الطبقة الموجودة فى القاع . تغسل الطبقة العليا للزيت المعادل بالتتابع بحوالى ٢٥ أو ٣٠ مليلتر من محلول الإيثانول حتى يختفى اللون الوردى الأحمر للفينول فيثالين . ثم ينقل المحلول فى قارورة مخروطية الشكل ويضاف كبريتات الصوديوم ويرج جيداً ثم تترك على الحامل لمدة ١٠ دقائق . ثم يرشح المحلول وتغسل القارورة بالهكسان (٥٠ مليلتر) ثلاث مرات ثم يرشح الغسيل . تغسل ورقة الترشيع بالهكسان وينقل الراشح داخل قارورة التبخير . ينقل المذيب كاملاً عند درجة حرارة ٤٠° س تحت ضغط منخفض .

٤ - تنقية حمض الاختبار خلال اليومينا :

يحضر محلول معلق من ١٥ جرام من اليومينا النشطة فى ٥٠ مليلتر هكسان ويصب مع التقليب داخل عمود الكروماتوجراف تترك الاليومينا تستقر حتى ينقص مستوى المذيب ١ - ٢ مليلتر فوق المكثف . بعناية يصب داخل العمود محلول من ٥ جرام من الزيت فى ٢٥ مليلتر من الهكسان يجمع كل السائل المزاج من العمود فى قارورة ذات قاع مستدير وسعتها ١٠٠ مليلتر ينقل

المذيب كاملاً عند درجة حرارة ٤٠° س تحت ضغط منخفض في جهاز التبخير الدوار .

٥ - التحليل المائي الانزيمى للجليسيريدات الثلاثية :

يوزن ١ , ٠ جرام من حضن الاختبار النقية كما فى الخطوة رقم ٤ وتوضع فى أنبوبة جهاز طرد مركزى . إذا كانت العينة ريت تستخدم مباشرة أما إذا كانت صلبة الدهن لابد من إذابته فى ٢ , مليلتر من الهكسان مع تسخين لطيف إذا تطلب الأمر .

يضاف ٢٠ ملليجرام من إنزيم ليباز و ٢ مليلتر من المحلول المحايد . رج بعناية ثم يضاف ٥ , ٠ مليلتر من محلول شولات الصوديوم . يدخل الغطاء ويرج بعناية ثم توضع لأنبوبة مباشرة فى حمام مائى درجة حرارته ٤٠° س + ٥° س . ثم يرج باليد لمدة دقيقة ثم تنقل من الحمام المائى وترج بقوة على جهاز الهز الكهربى لمدة دقيقتين بالضبط . ثم تبرد مباشرة بغمس الأنبوبة فى الماء . يضاف ١ مليلتر من حمض الهيدروكلوريك ويضاف ١ مليلتر من ثنائى ايثل إيثر ثم يدخل الغطاء ويرج بقوة بواسطة جهاز الهز الكهربائى . ثم تدور فى جهاز الطرد المركزى . ويستعمل الطبقة العليا مباشرة فى فصل ٢ - الجليسيريدات الأحادية بواسطة جهاز كروماتوجراف ذو الطبقة الرقيقة : كما هو فى الخطوة رقم ٢/٦ .

٦ - فصل ٢ - الجليسيريدات الأحادية :

١ - تجهيز الشرائح :

تنظف الشرائح الزجاجية بالإيثانول والهكسان والأسيتون لإزالة المواد الدهنية تماماً يوزن ٣٠ جرام من السليكا جل وتوضع داخل قارورة مخروطية

سعة ٢٥٠ مليلتر ويضاف ٦٠ مليلتر من الماء المقطر ثم تغطى القارورة وترج بقوة لمدة دقيقة ينقل المحلول مباشرة إلى الناشره وتنشر طبقة سمكها ٢٥ , مليلتر على شرائح نظيفة . تترك الشرائح حتى تجف لمدة ١٥ دقيقة فى الهواء ثم بعد ذلك لمدة ساعة فى الفرن عند درجة حرارة ١٠٣ + ٢ س . تبرد الشرائح فى مجفف فى درجة حرارة الغرفة قبل الاستعمال .

٢ - فصل ٢ - الجليسيريدات الأحادية بجهاز كروماتوجراف ذو الطبقة الرقيقة :

يوضع المستخلص على شريحة جهاز الكروماتوجراف بالميكرومحقن أو بأنبوبة شعرية حوالى ١,٥ سم من حرف القاع كخط رفيع ثم توضع الشريحة فى حوض به المذيب المظهر المشبع عند درجة حرارة ٢٠ س حتى مقدمة المذيب تصل حوالى ١ سم من الحرف العلوى تجفف الشريحة فى الهواء عند درجة حرارة ٢٠ س وترش بمحلول ٧,٢ - ثنائى كلوروفلورسين ، علم حزمه الجليسيريدات الأحادية تحت ضوء الأشعة فوق بنفسجية وتكشط باستخدام الملعة أو السكين الصغيرة متجنباً إزالة المركب المكون الباقى على بداية الخط .

تجهيز وتحليل إسترات الميثيل للجليسيريدات الثلاثية :

٢ - الجليسيريدات الأحادية :

يجهز إسترات الميثيل من الجليسيريدات الثلاثية و ٢ - الجليسيريدات الأحادية تبعاً للأيزو ٥٥٠٩ كما يأتى :

١ - التصبن والتأستز :

يدخل حوالى ١ , جرام من الجليسيريدات الثلاثية النقية من عينة الاختبار فى قارورة سعتها ٥٠ مليلتر ويضاف ٤ مليلتر من محلول ميثانوليك هيدروكسيد الصوديوم كما هو مبين فى جدول (١) .

جدول (١)

الكمية المناسبة من الكواشف وحجم القارورة وعلاقتها بحجم عينة الاختبار

عينة الاختبار	قارورة	محلول هيدروكسيد صوديوم	محلول ثلاثي فلوريد البورون	هبتان
مليجرام	مليتر	مليتر	مليتر	مليتر
٢٥٠ -	٥٠	٤	٥	٣ - ١
٥٠٠ -	٥٠	٦	٧	٥ - ٢
٧٥٠ -	١٠٠	٨	٩	٨ - ٤
١٠٠٠ -	١٠٠	١٠	١٢	١٠ - ٧

في حالة ٢ - الجليسريدات الأحادية يضاف السيليكا جل المجمعة أو مستخلص الجليسريدات الأحادية من السيليكا جل مباشرة دخل قارورة سعتها ٥٠٠ مليتر .

يضاف كرات الزجاج إلى القارورة ودور الكشف ومرر الماء البارد عند درجة حرارة ١٥°س خلال المكثف باستخدام دورة الماء المثليج . ثم يغلى تحت العاكس لمدة ١٠ دقائق حتى تختفى قطرات الدهن . يضاف ٥ مليتر من ميثانوليك ثلاثي فلوريد البورون بواسطة ماصة مدرجة إلى السائل المغلى ويستمر الغلى لمدة دقيقتين . يضاف كمية من الهبتان جدول (١) ويستمر في الغلى لمدة دقيقة . يوقف التسخين ويبرد عند درجة حرارة الحجرة ثم بعد ذلك . تبعد القارورة . يضاف جزء بسيط من المحلول المركز لكلوريد الصوديوم وترج القارورة بلطف عدة مرات .

يضاف أكثر من محلول كلوريد الصوديوم المركز حتى يصل مستوى السائل حتى رقبة القارورة .

تنقل طبقة الهبتان بماصة باستير إلى أنبوبة اختبار . يضاف كبريتات الصوديوم اللامائية ثم يرج . وتترك لمدة ٥ دقائق وتنقل داخل قوارير صغيرة سعة كل منها ٤ مليلتر ومثبت عليها غطاء من التفلون .

تحليل استرات الميثيل بجهاز الكروماتوجراف السائل الغازي :

من أجل تحليل استرات الميثيل يجب ملاحظة ما يأتي :

- ١ - درجة حرارة عمود جهاز الكروماتوجراف السائل الغازي .
٧٠°س - ٣ دقيقة - ٢٠°س / دقيقة - ١٥٠°س - ٢ دقيقة - ٢٥°س
س لكل دقيقة - ٢٠٠°س - ١٥ دقيقة .
- ٢ - المحقن - ٢١٠°س .
- ٣ - الكشف - ٢٢٠°س .
- ٤ - حامل الغاز - نيتروجين .
- ٥ - درجة أنسياب حامل الغاز - ٢٠ مليلتر / الدقيقة .

٩- التحليل الكيفي :

- يحلل المرجع القياس من خليط استرات الميثيل من الأحماض الدهنية ك٤ - ك٥ بحقن كمية محددة (١,٠ - ٢,٠ ميكرو لتر) تحت الظروف السابق ذكرها في بند ٨ . ثم أحقن العينة (١ ميكرو لتر) كما تم الحصول عليها في بند ٧ ويلاحظ تعيين القمة بالمقارنة بوقت الاحتباس للمحلول القياسي لاسترات الميثيل وقت الاحتباس لمختلف استرات الميثيل مبين في الجدول رقم ٢ .

جدول رقم (٢)

أوقات الاحتباس لإسترات الميثيل للأحماض الدهنية

وقت الاحتباس	استر ميثيل حمض الدهن
١, ١٨	ك٤
٢, ٩٨	ك٦
٥, ٢٦	ك٨
٥, ٩٩	ك٩
٦, ٦٤	ك١٠
٧, ٢٢	ك١١
٧, ٦	ك١٢
٨, ٦٧	ك١٣
٩, ٦٥	ك١٤
١٠, ٤٣	ك١٥
١١, ٠١	ك١٦
١١, ٣١	ك١٦ : ١
١١, ٥٤	ك١٧
١٢, ١٠	ك١٨
١٢, ٤١	ك١٨ : ١
١٣, ٠٢	ك١٨ : ٢
١٣, ٥٨	ك١٨ : ٣
١٣, ٩١	ك٢٠
١٤, ٠٨	ك٢٠ : ١
١٦, ٧٧	ك٢٢ : ١
٢١, ١٥	ك٢٤ : ١

١٠- التحليل الكمي :

جميع عناصر العينة تمثل على الكروماتوجرام وكل المساحة الموجودة تحت القمة تمثل ١٠٠ ٪ من عناصر العينة .

ويعرف الجهاز بمعطيات البيانات حتى يمنع قمة المذيب من الدخول في الحسابات . ويحقن الجهاز بحجم مناسب (١ ، - ٢ ميكرو لتر) من محلول المخلوط من استرات الميثيل للأحماض الدهنية . وتحليل النتائج لابد وأن يكون مماثل للمكونات القياسية .

تحقق استرات الميثيل من الجليسريدات الثلاثية ، ٢ - الجليسريدات الأحادية للعينة كما هو مبين في الخطوة رقم ٩ وتستخدم النتائج المتحصل عليها للمقارنة بالصورة الجانبية لحمض الدهن وعلاوة على ذلك تستخدم في الحسابات .

إذا كانت جرعة الكروماتوجراف لا تحتوي على الدامج الموحد ، تعيين المساحة الموجودة تحت كل قمة بضرب ارتفاع القمة في العرض عند وسط الارتفاع . عند الضرورة تؤخذ داخل الحسابات التخفيفات المختلفة التي تؤخذ أثناء التسجيل .

حساب نسبة كل قمة كما يأتي :

$$\text{النسبة بالكتلة لكل مركب كميثل استر} = \frac{1}{2} \times 100$$

١ أ هي المساحة الموجودة تحت القمة المتطابقة مع المركب

٢ أ هي حاصل جمع المساحات الموجودة تحت كل القمم

توضيح وصياغة النتائج :

يحسب معامل الإثراء لحمض البالميتيك والنسب الأخرى لحمض الدهن من تركيب الجليسريدات الثلاثية ، ٢ - الجليسريدات الأحادية كما يأتي :

معامل الإثراء لحمض البالميتيك Polmitic acid enrichment factor

نسبة حمض البالميتيك ك١٦ : صفر في ٢ - الجليسريدات الأحادية

نسبة حمض البالميتيك ك١٦ : صفر في الجليسريدات الثلاثية

نسبة حمض البالميتيك ك١٦ : صفر في ٢ - الجليسريدات الأحادية

نسبة حمض ميويستيك ك١٤ : صفر في الجليسريدات الثلاثية

نسبة حمض أوليك ك١٨ : ١ في الجليسريدات الأحادية

نسبة حمض أوليك ك١٨ : ١ في ٢ - الجليسريدات الأحادية

بمقارنة الصورة الجانبية Profile لحمض الدهن ، قيمة معامل الإثراء لحمض البالميتيك ونسب حمض الدهن الأخرى بتطابق الصورة الجانبية لحمض الدهن والنسبة المتطابقة والمحاثة للزيوت أو الدهون النقية كما هو مبين في جدول ٣ ، ٤ .

جدول رقم ٣

معامل الإثراء لحمض البالميتيك ونسب الأحماض الدهنية الأخرى فى الدهون المختلفة

الزيت / الدهن	نسب الحمض الدهنى		
	١	٢	٣
دهن خنزير	٢,٧٠	٥,٠٠	٤,٢٠
دهن بقر	,٦٠	٣,٧٠	١,١٠
دهن غنم	,٧٠	٤,٦٠	٥,٨٠
دهن جمل	,٤٢	١,٦٤	٥,٢٣
دهن ريدة	١,٢٠	٣,٧٠	٢,٣٠
دهن فراخ	,٥٠	١٦,٠٠	,٧٤

الصور الجانبية Profile لمختلف حمض الدهن فى العينات من تتطابق الزيوت / الدهون النقية سوف تؤخذ وتغش بالدهون الغريبة . العينات ذات القيمة العالية فى معامل لإثراء enrichment ونسب حمض الدهن الأخرى سوف توصف أو تسجل كعينا مشتبته بتلوئها بدهن الخنزير .

المراجع العامة

المراجع العامة

المرجع العربية :

- القرآن الكريم .
- جامعة الدول العربية ١٩٧٢ «طريقة قياسية لتمييز دهن الخنزير فى الزيوت المهدرجة والدهون الحيوانية» المنظمة العربية للمواصفات والمقاييس .
- الهيئة العربية السعودية للمواصفات ولقاييس ١٩٨٧ «الكشف عن دهون الخنزير فى الأغذية» .
- الكشف عن لحوم ودهون الخنزير فى المنتجات الغذائية للدكتور/ محمد محمد محمد هاشم، الدار السعودية للنشر والتوزيع ٢٠٠٤ .

المرجع الاجنبية :

- Abdel - Fattah. L. E. Detection and determination of pig fat in other animal fats M.sc. thesis Faculty of Pharmacy Cairo University, 1970.
- Abdel - Fattah. L. E. Analysis study of some food and pharmaceutical lipids products ph. D. thesis Faculty of Pharmacy. Cairo University, 1974.
- Abo Eol Fattah, L. Sayed Ph. D. of pharmacy thesis (Analytical chemistry). Cairo University, 1974.
- Amer, M M, Abdel Kader S., Ahmad and Laila El Sayed proceeding from the third Arab congress, 1972.

- A. O. C. S., official and tentative Methods the american oil chemists society, 2 nd ed chicago III. Ionois, 1964.
- AOAC. Official methods of analysis of the association of official Dgrianltural chemists, 12th ed. Washington, D. C., 1975.
- Atassi, M, Z, Th Complete antigenic strudure of myoglobin : Approches and conculusions for antigenic structures of proteins ch. 3 in immuno chemistry of proteins, vol II, 1977.
- Barford, R. A., Luddy, EF., erb, S.F, Madidman, p. and Riemenschneider, Glycerid distribution in adipose and liver glycerides of animals. J Amer. oil cemists, Soc. 42, 1965.
- Brocherhoff, H., Hoyle, R. J. and Wolmark, N. Positional distribution of fatty acids in trigly cerides of animal depat fats. Biochem. Biopys. Acta, 116, 1966.
- Bruce, W., R. Pork lootest USDA protocal kit for Elisa detection of pork in cooked or canned mat products, ABC research laboratory manual, Gainesville, Florida, 1989.
- Carnegie, P. R., Ilic, M. Z., Etheridge, M.O., and collins, M. G., Improved high. performance liquid chromates graphic method for analysis of histidine dipeptides anserine, carhosine and balenine present in Fresh meat, J. of chromatography, 261, 1983.
- Carnegie, P. R., Handbook of HPLC for the separation of amino acid, peptides and proteins, Vol. II, W. S. Hancock (ed.), CRC Press, Boca Raton, Fbrida, 1983.

- Carnegie, P.R., Collino, M. G. and Ilic, M. Z., use of histidine dipeptides to estimate the proportion of pig meat in processed meats. Meat science, 10, 1984.
- Cattaneo, P., Bianchi, M., A, Beretta, G. and Cantoni, C. keeping characteristic of lamb and its nutritive value, Industria, Alimentari, 18 (9), 1979.
- Cauglity, E. J. and Lehman, L. W., The preparation of Alkyl Esters from highly unsaturated triglycerides, J. Am. oil chem. Soc. 42, 1963.
- Codex Alimentarius, Volume XI, part II, P. 149, Stern 28, 1981.
- Coleman, M. H., The pancreatic hydrolysis of natural fats. III The influence of the extent of hydrolysis on monoglycerides composition J. Am. oil chem. soc. 40, 1963.
- Cortecs diagnostics, Biokits, Cooked meat species identification kit, for the qualitative detection of species content in cooked meats, meat products and animal feeds by enzyme immuno assay, U. K., 1993.
- Cortecs diagnostics, Biokits, Meat species Identification for the quantitative detection of pork content in uncooked meat and meat products by enzyme immuno assay (High Sensitivity), U.K, 1994.
- Dashlouty, A.A. Studies on the quality some meat products, thesis, Faculty of Agric. Ain shans university 1978.

- Dattillo, M. and Congiu F., Separation of soluble proteins of lambs and kids of different age, by means of isoelectric focusing, rivista d'izootecny veterinaria No 159, 1978.
- Day, J. A. and Lumley, I. D., Detection and determination of pork in other fats. The laboratory of the Government chemist., Cornwall House, Waterloo, London, 1985.
- Distav, E., and Baur, F., The determination of mono - Gli. and triglyceride concentration by column chromatography J. Assoc. office, Agr. chemists. 48, 1965.
- El Dashlouty, A., Comparative studies on the canned beef and pork. J. food Sa. g. No. 112 PP. 1-12, 1981.
- El Mossalami, E., El Nawawi, F., Roushdy, S. and El Afify Meat Hygiene and technology, Cairo University, Faculty Veterinary medicine, 1995.
- El Sayed, L. and Dashlouty, A. The detection and determination of pork in canned meat and sausages, La rivista italiana delle sostanze grasse - vol. Lvi, 1979.
- Hamm, R, In : The physiology and biochemistry of muscle as a food, University of Wisconsin Press, Madison, 1966.
- Harris, H. and Hopkinson, D.A., Handbook of Enzyme Electrophoresis in human genetics North - Holland, 1976.

- Hayden, A. R., Detection of chicken flesh in beef susage, J. food Sci, 42, 1977.
- Hayden, A. R., Immunochemical determinatis of species of crigin of meat products. Ph. D thesis, University of Wisconsin, Madison, 1979 a.
- Heinert, H. H. and klinger, A. Specis - Specific protein differentiation. protien and enzyme patterns in roe deer & red deer, Die fleisch wirtschaft, 60, 1980.
- ISO, 6800, 1985 E.
- Janssen, F. W., Voortman, G, and De Baaÿ, J. Detation of weat gluten, whey proteine, casein, oralbumin and soy proteinin heated meat Unters, Forsch, 1987.
- Hanssen, F.W., Hagele, G.H., voorpostel, A.M.B., and de BAA J. A., Myoglobin analysis for determination of beef, pork, Horse, sheep, and kangaroo meat in blended cooked products, J. of food science, V. 55, No. 6, 1990.
- King, N. L. Species identification of cooked meats by Enzyme - staining of isoelectric focusing Gels, Csiro division of food research, meat research laboratory, Cennon Hill, Queensland, Australia, 1984.
- Mattson F.H, Volpenhein, R.A, and Lutton E.S., Patterns in the triglyceride structure of natural fats, fatte selfen anstrichmitiel 4, 1973.

- Nour El Din, H., Soluman, A., Ashour, F., and Bayoumi, A. chemical composition of pork and mutton in Egypt, Food technology Dep. Faculty of Agriculture Moushtoh, Zagazig university, 194.
- Olsman, W. J., Slump, P. Developments in meat Science - 2, Applied Science published London, 1981.
- Pavlovski, P. E., and palmin, V. V., Biocenistup of meat and meat products. Food industry pub. Moscow, 1963.
- Pearson, D., The chemical analysis of food, National college of food. Tech. Univ. of reading, Weybridge, Surrey. J. and A. Chirch 1970.
- Prasad V., S. S. and Misra, D. S., Differentiation of meats of different species of animals by muscle esterase pattern in different age and sex groups. Indian J. Anim Sci 51, 1981.
- Ruacaff, L., and Karleskind, Analysis of animal fat mixtures cooked meat products and derivatives, are free from pork fat., department for research and analytical formulation laboratories Wolff - Clichy, 1983.
- Slam, M., Hamed, O., Nahed, G. and Wafaa, W. Zoonoses, Cairo University, Faculty of veterinary medicine, Hygiene, Husbandry and zoonoses Department 1995.
- Sokolov, A. A., Physico - chemical and biochemical basis of meat products technology. food industry pub., Moscow, 1965.

- Stinson, C. G., Deman, J. M. and Bowland, J. P., Fatty acid composition and glyceride structure of piglet body fat from different sampling sites, J. Amer. oil chemists soc. 44, 1967.
- Thomas, A. E., Scharaum, J. E., and Rolston, , Quantitative estimation of isomeric monoglycerides by thin layer chromatography, J. Am. oil chem. soc. 42, 1965.
- Tuna, N. and Mangold, H. K. Evaluation of the atherosclerotic plaque, the university of Chicago, 1965.
- Williams S. K. A., oil fats and fatty acids. Their practical examination fourth Edition J. and A. Churchill LTD London, 1966.

الفهرس

الموضوع	الصفحة
مقدمة	٧
الفصل الأول	
أدلة تحريم لحوم الخنزير ومتجاته فى الإسلام	٩
الفصل الثانى	
الكشف عن جيلاتين الخنزير فى المواد الغذائية	١١
الفصل الثالث	
الكشف عن لحوم الخنزير ومتجاته فى المنتجات الغذائية	٢٩
١ - الكشف عن لحوم الخنزير ومتجاته فى المنتجات الغذائية	
بطريقة كورتكس المطورة	٣١
٢ - المناعة الكيميائية فى الكشف عن لحوم الأغنام والخنزير	
والخيل فى منتجات لحوم الأبقار بالأمصال المضادة	
لميوجلوبين هذه الحيوانات	٤٩
٣ - طريقة التعريف السريع على لحوم الخنزير فى منتجات اللحوم	
بالانتشار المناعى فى الأجارجيل	٧٧
٤ - الكشف عن لحوم الدواجن والخنزير المهطية واللحوم المعلبة	
بطريقة الامتصاص المناعى والارتباط الانزيمى	٨٥

الصفحة

الموضوع

- ٥- التعرف على اللحوم بجهاز الكروماتوجراف السائل ١٠١
- ٦- طريقة اليسا المعدلة للتعرف على اللحوم الطازجة باستخدام مضادات الأمصال الخام وثابتة التفاعل المناعى ١١٩
- ٧- طريقة الانتشار المناعى فى التعرف على أنواع لحوم الحيوانات ... ١٤١
- ٨- أوفيدىن (بيتا - ألانيل - ل - مثيل هيسيدىن، يالانين) والهيستيدىن ثنائى البيتيد فى لحوم الخنزير ١٥٥
- ٩- الكشف عن الخواص الجزئية لبروتينات لحوم الخنزير بالهجرة الكهربائىة للمناعة فى الأجارجيل ١٧١
- ١٠- التعرف على اللحوم فى المنتجات الغذائىة ١٨٣

الفصل الرابع

- الكشف عن دهون الخنزير فى المنتجات الغذائىة ١٨٩
- المراجع العامة ٢٠٧
- الفهرس ٢١٥